

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Sección de Químicas



TESIS DOCTORAL

**Estudio estructural de discontinuidades en DNA mediante
polimerización enzimática**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Dolores Delgado González

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEL

FACULTAD DE CIENCIAS

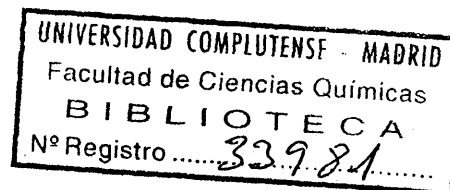
SECCION QUIMICAS

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE DISCONTINUIDADES
EN DNA MEDIANTE POLIMERIZACION ENZIMATICA

b25018024
i37435140

MEMORIA que para optar al grado
de Doctor en Ciencias Químicas,
presenta D. MARIA DOLORES DELGA
DO GONZALEZ.

Madrid, Abril 1974.



Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Grupo de Biofísica de la División de Física de las Radiaciones de la Junta de Energía Nuclear.

Deseo agradecer al Instituto de Estudios Nucleares el apoyo económico recibido durante la realización de la parte experimental de este trabajo. Así mismo, mi agradecimiento al Prof. A.M. Municio por sus consejos y apoyo.

Más especialmente deseo agradecer al Dr. C.A. Dávila la sugerencia del tema, dirección y constante colaboración, que ha permitido llevar a fin este trabajo. Mi agradecimiento, también, al Dr. F. Mingot por su colaboración.

INDICE

- I. INTRODUCCION.
- I.1. MECANISMO DE ACCION DE LA DNA POLIMERASA.
- I.1.1. INTRODUCCION.
- I.1.2. DNA POLIMERASA CONOCIDAS.
- I.1.3. DNA POLIMERASA I.
- I.1.3.1. Función de la DNA Polimerasa I.
- I.1.3.2. Estructura y composición.
- I.1.3.3. Centro activo.
- I.1.3.4. Separación de las actividades de la enzima.
- I.1.3.5. Unión al DNA.
- I.1.3.6. Unión a los desoxirribonucleotidos.
- I.1.3.7. Actividades hidrolíticas de la DNA Polimerasa.
- I.1.3.8. Otras actividades de la DNA Polimerasa.
- I.1.3.9. Modelos para la polimerización.
- I.1.3.10. Iniciación de cadenas.
- I.2. DEGRADACION RADIOLITICA DEL DNA.
- I.2.1. RADIOLISIS DE SOLUCIONES ACUOSAS.
- I.2.2. RADIOLISIS DE LOS COMPONENTES DE ACIDOS NUCLEICOS.
- I.2.3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA RUPTURA SIMPLE RADIOINDUCIDA.
- I.3. DEGRADACION ENZIMATICA DEL DNA POR DNasa.

- I.3.1. ACCION DE LA DNasa I PANCREATICA.
- I.3.2. ESPECIFICIDAD DEL ATAQUE ENZIMATICO.
- I.3.3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA RUPTURA SIMPLE.
PRODUCIDA POR DEGRADACION ENZIMATICA.
- I.4. DEGRADACION MECANICA DEL DNA.
- I.4.1. ACCION DE LAS FUERZAS TANGENCIALES SOBRE
EL DNA.
- I.4.2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA FRACTURA MECANICA.
- I.5. ASPECTOS CINETICOS DE LAS DEGRADACIONES.
- I.5.1. BASE ALEATORIA DE LA DEGRADACION.
- I.5.2. PROBABILIDAD DE FRACTURA.
- I.5.3. INTERVALO DE DESESTABILIZACION DE UNA ROTURA
SIMPLE.

II. MODELO ESTADISTICO DE POLIMERIZACION DE DNA.

III. MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES.

III.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PREPARACIONES DE DNA.

III.1.1. AISLAMIENTO DE DNA.

III.1.1.1. Material biológico de partida.

III.1.1.2. Métodos de aislamiento de DNA.

III.1.1.3. Conservación y disolución de las muestras de DNA.

III.1.2. CARACTERIZACION DE LAS PREPARACIONES DE DNA.

III.1.2.1. Pureza del DNA.

III.1.2.2. Determinación del contenido en 2-desoxirri-
bosa.

III.1.2.3. Determinación del contenido en fósforo.

III.1.2.4. Determinación del coeficiente de extinción
molar.

III.1.2.5. Determinación de la relación de bases.

III.1.2.6. Curvas de transición térmica.

III.1.2.7. Cromatografía en DEAE-celulosa.

III.1.2.8. Determinación de la viscosidad intrínseca.

III.1.2.9. Sedimentación en gradiente de sacarosa.

III.2. METODOS DE DEGRADACION DE DNA.

III.2.1. DEGRADACION POR IRRADIACION CON GAMMA.

III.2.2. DEGRADACION POR TRATAMIENTO ENZIMATICO.

III.2.3. DEGRADACION POR TRATAMIENTO MECANICO.

III.3. AISLAMIENTO DE DNA POLIMERASA.

III.3.1. MATERIAL BIOLOGICO DE PARTIDA.

III.3.2. FRACCIONAMIENTO ENZIMATICO.

III.3.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

III.3.4. REQUERIMIENTOS DE LA DNA POLIMERASA.

III.4. ENSAYO DE LAS MUESTRAS DE DNA FRENTE A LA
DNA POLIMERASA.

III.4.1. POLIMERIZACION.

III.4.2. DETECCION DE LA POLIMERIZACION.

III.4.2.1. Comparación de los métodos.

III.4.2.2. Método de cromatografía.

III.5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

III.5.1. CALCULO DE d_{RS} A PARTIR DE LOS DATOS DE FRAC-
CIONAMIENTO CROMATOGRAFICO.

III.5.2. EXPRESION DE LA d_{RS} EN FUNCION DE LA EXTEN-
SION DE LA DEGRADACION.

III.5.3. EXPRESIONES PARA LA POLIMERIZACION PARA CADA
UNO DE LOS METODOS DE DEGRADACION UTILIZADOS.

III.5.3.1. Degradación enzimática.

III.5.3.2. Degradación radiolítica.

III.5.3.3. Degradación mecánica.

IV. PRESENTACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS EX-
PERIMENTALES.

IV.1. COMPROBACION EXPERIMENTAL DE LOS PROCESO DE
DEGRADACION.

IV.1.1. ASPECTOS CINETICOS.

IV.1.2. PROBABILIDAD DE PRODUCCION DE ROTURAS SIMPLES.

IV.2. FENOMENOLOGIA DE LA POLIMERIZACION.

IV.2.1. CRITICA DE LA DEPENDENCIA DE LA POLIMERIZACION
CON EL PESO MOLECULAR.

IV.2.2. ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE POLIMERIZACION.

IV.2.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LOS REACTIVOS.

IV.3. COMPROBACION EXPERIMENTAL DE LAS EXPRESIO-
NES DE POLIMERIZACION.

IV.3.1. POLIMERIZACION EN FUNCION DE $d_{(3')OH}$.

IV.3.2. POLIMERIZACION EN FUNCION DE LA EXTENSION
DEL TRATAMIENTO.

IV.3.2.1. DNA degradado por radiación gamma.

IV.3.2.2. DNA degradado por tratamiento con DNasa.

IV.3.2.3. DNA degradado mecánicamente.

IV.3.3. CONSTANTE DE EFICACIA DE LA CANTIDAD DE PO-
LIMERIZACION DETECTADA.

V. CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

Después de la elucidación por Watson y Crick de la estructura del DNA ⁽¹⁾ se han realizado gran cantidad de estudios dirigidos a descubrir como se replica este material genético. Las singularidades especialísimas que concurren en esta molécula, el que en ella se contenga toda la información del organismo, cuya expresión constituye la fenomenología observable en los seres vivos, hacen que se haya acumulado gran información física, bioquímica y biológica sobre esta macromolécula y las posibles alteraciones y transferencias de información que pueda presentar.

Uno de los agentes capaces de afectar las características estructurales del DNA es la radiación ionizante. A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados estudiando las modificaciones radioinducidas en el DNA, quedan bastantes puntos por dilucidar a cerca de la alteración producida en la macromolécula y como esa modificación repercute en su actividad biológica.

Si bien en la mayor parte de los grupos dedicados a este tipo de estudios y, concretamente, en el grupo de Biofísica de la J.E.N., en donde se ha realizado este trabajo, se evoluciona hacia el estudio de los fenómenos de reparación de estas modificaciones, en este trabajo hemos querido concretarnos al estudio de algunos aspectos que permanecen oscuros relativos a cómo es la modificación inducida.

Aunque inicialmente pretendíamos estudiar cómo las alteraciones producidas en el DNA por las radiaciones ionizantes modificaban su capacidad para autorrepli

carse, ante la enorme dificultad que presenta la utilización del sistema replicativo de DNA debido al gran desconocimiento actual a cerca de las enzimas implicadas en él (2, 3, 4, 5), tuvimos que abandonar la primitiva idea, concretándonos al estudio de la modificación radioinducida mediante un sistema enzimático que reciba información del DNA y que sea sensible a alteraciones en su estructura, de manera que permita detectar diferencias en las modificaciones producidas en la molécula de DNA por variaciones en su comportamiento frente a ese sistema enzimático.

110 d an 7

En este sentido hemos utilizado un sistema de polimerización de DNA "in vitro" que necesita de una molécula de DNA que sirva de molde para construir la copia, el constituido por la DNA Polimerasa aislada de Escherichia coli.

La presente memoria reúne los resultados de este intento hasta un punto en el que hemos creído existe una coherencia en el conjunto, permitiéndonos concluir que este sistema es capaz de ayudar a aclarar algunos puntos relativos a la estructura de la modificación producida.

Hemos procurado realizar un tratamiento general de los resultados obtenidos a fin de poder cuantizar en la correlación entre comportamiento ante el sistema enzimático elegido y tipo de modificación local producida en el DNA.

I.1. MECANISMO DE ACCION DE LA DNA POLIMERASA.

I.1.1. INTRODUCCION.

El conocimiento que existe actualmente sobre las características del mecanismo de actuación de la DNA Polimerasa es la razón principal que nos ha llevado a seleccionar esta enzima para el estudio de las alteraciones producidas en el DNA por diferentes agentes degradantes. La abundante información que hoy se acumula sobre el mecanismo de esta polimerización "in vitro" facilita la interpretación de las variaciones en el comportamiento de las muestras de DNA diferentemente degradadas al actuar como moldes frente a dicha enzima.

Sin embargo, podemos considerar que los conocimientos actuales sobre la estructura y actuación in vitro de las DNA Polimerasas conocidas son altamente sofisticados. Evidencia de esta afirmación es la gran precisión con que se han utilizado las enzimas purificadas para determinar estructura genética y función a nivel bioquímico (6, 7). Contrariamente a este éxito, poco se sabe, y lo que se conoce es incierto, sobre el papel de las polimerasas en el interior de las células. Cualquiera de estas enzimas copia al DNA molde exactamente (8, 9, 10), replicándole de manera semiconservativa (11, 12), por lo que cualquiera de ellas podría ser el catalizador de la replicación del cromosoma.

Otras propiedades, de las que hablaremos mas detenidamente, sugieren, en cambio, funciones de reparación para ellas (13), aunque la mayor parte de esas propiedades no son incompatibles con un modelo de replicación de cromosomas (14, 15). Esto hizo que durante los pasados años se les supusiese un papel preponderante en

la maquinaria enzimática responsable de la duplicación del DNA en la célula⁽¹⁶⁾. Gran respaldo de estas suposiciones fueron las experiencias de Kornberg⁽¹⁷⁾ consiguiendo la síntesis in vitro de un DNA dotado de actividad biológica idéntica a la del utilizado como molde, el DNA de fago ϕ 174 en un sistema acelular utilizando la DNA Polimerasa aislada por él a partir de E. coli, la enzima conocida actualmente por la DNA Polimerasa I.

Posteriormente se han realizado diversos intentos para descubrir nuevas actividades sintetizantes de DNA que puedan tener papel importante en la replicación cromosómica. Estos intentos han incrementado grandemente el número de DNA Polimerasas conocidas. Intentamos presentar en el cuadro 1 un resumen de ellas citando las características más esenciales que presentan.

I.1.2. DNA POLIMERASAS CONOCIDAS.

Como DNA Polimerasa se designan a todas aquellas enzimas que catalizan la polimerización de desoxirribonucleotidos y que requieren la información de un molde para la selección de los nucleotidos. La mayoría de estas enzimas sedimentan sobre 6-8 S en gradiente de sacarosa, lo cual corresponde a pesos moleculares de alrededor de 100.000 daltons. Algunas otras enzimas polimerizantes de desoxirridonucleotidos presentan pesos moleculares mucho mas bajos, por ejemplo, algunas especies moleculares de DNA Polimerasa de E. coli aisladas por Cavalieri et al.⁽¹⁸⁾ y la desoxinucleotidiltransferasa de extractos de células de mamíferos de coeficiente de sedimentación 3.3 S, que utiliza igualmente la información de un DNA molde para la selección de nucleotido resultando por tanto una DNA Polimerasa⁽¹⁹⁾.

~~Se han aislado DNA Polimerasas a pat~~

67 Se han aislado DNA Polimerasas a partir de una amplia variedad de organismos: bacterias, ^(10,20-23), células animales ^(24,25) y células infectadas por virus ^(26,27). Aunque todas ellas requieren la presencia de las cuatro (desoxirribonucleosido# trifosfato) y Mg^{2+} para realizar la polimerización, se diferencian en el tipo de molde que utilizan, en las otras actividades que suelen acompañar a la polimerizante y en el comportamiento frente a algunos reactivos.

Uno de los organismos mas estudiados en este sentido ha sido E. coli. Se han aislado varias enzimas polimerizantes de DNA a partir de esta bacteria. Además de la DNA Polimerasa I que hemos mencionado ⁽⁸⁾, se han purificado la DNA Polimerasa II ⁽⁹⁾ y la DNA Polimerasa III ⁽¹⁰⁾ y se han estudiado los sistemas complejos DNA-membrana ⁽²⁸⁾ y células permeables ⁽²⁹⁾ como sistemas sintetizantes de DNA.

La actividad principal polimerizante de DNA en contrada en extractos solubles de E. coli salvaje (Pol^{+}) es debida a la enzima purificada por A. Kornberg y colaboradores ^(8,30-32) y ahora denominada como Polimerasa I ^(21,33). Con el aislamiento por De Lucia y Cairns ⁽³⁴⁾ de mutantes de E. coli faltos de actividad Polimerasa I y las experiencias de Grossy Gross ⁽³⁹⁾, parece evidente que esta enzima probablemente no es esencial para la replicación del DNA, ya que los mutantes faltos de ella crecen normalmente. La utilización de los mutantes Pol^{-} ha hecho posible la detección de los otros sistemas polimerizantes existentes en menor proporción en esta bacteria.

Las propiedades que han sido descritas para la Polimerasa II ^(9,21,33,35) (resumidas en el cuadro 1), hacen poco probable que esta enzima derive de la DNA Polí-

Núm. bro	Origen	Requieren	Molde	Daltons PM 10 ⁻³	Núm. moléculas/célula	Velocidad síntesis(+)	Tipos actividades	Características	Características sobresalientes método aislamiento.	Citas
DNA Polimerasa I	E. coli salvaje (Pol ⁺)	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde (174)	-poli(dAT)(8) -DNA con roturas simétricas (149) -DNA degradado con ixomidiasa III (3). -No utiliza DNA doble hélice sin discontinuidades. -Requiere mínimo de un extremo iniciador con grupo (3')-OH (149, 175).	109 (32)	400 (31)	10 ³ (8)	-Actividad polimerizante en dirección 5'→3'. -Actividad exonucleolítica, tanto desde extremo 5' como desde el 3' (166, 167). -Cataliza pirofosforólisis con PPI (159). -Cataliza el cambio de pirofosfato de los dNTP (159).	-Formada por una cadena polipeptídica sencilla (32). -Contiene un grupo sulfhidrilo capaz de reaccionar con Hg III (32, 160). -Contiene un enlecisulfuro. -No posee grupo prostético (8). -Residuo aminoterminal: metionina (32). -Un solo centro activo para DNA (8).	-Purificación de extractos celulares por precipitación con sulfato de estreptomina, antolisis de DNA, precipitación fraccionada con sulfato amónico, y cromatografías en DEAE celulosa, fosfoceululosa y Sephadex G-100 (31, 32).	3, 4, 8, 12, 17, 20, 21, 26, 27, 30-33, 67, 69, 71, 73, 137, 147-149, 152-159, 160, 164, 166, 167, 169, 172, 174, 183.
		dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde	-DNA con roturas de cada una sencilla (DNA tratado con nucleasas III) (9, 21). -DNA con roturas simples de baja actividad (9). -No utiliza poli (dA-dT) (41, 184). -DNA desnaturado (33). -Requiere mínimo de extremo iniciador con grupo (3')-OH (9).	120	100 (9, 41) 17 (184)	50 (10, 184)	-Síntesis de DNA en dirección 5'→3' sin iniciación de nuevas cadenas (9). -Actividad exonucleolítica sobre DNA de cadena sencilla desde extremo 3'. No cataliza hidrólisis de DNA desde extremo 5' (10, 184, 185). -Cataliza pirofosforólisis de DNA y el cambio de PPI en las dNTP (184).	-Homogeneidad por electroforesis en gel de poliamicamida. -Separable de Polimerasa I, por cromatografía en DEAE celulosa o por sedimentación en gradiente de Glicerol (184). -Act. esp. de enzima es menor del 10 % de la DNA Polimerasa I (9). -Susceptible de inhibición sulfidrica. -Insensible a inhibición por antisuero contra Polimerasa I. -Distintamente más sensible f Polimerasa I a inhibición por Sales (9). -No estimulada por ATP.	-Purificación de extractos celulares en prensa francesa con Glicerol (21) AE=30(++) -Solubilización de actividad con complejo neutro de DNA con altas concentraciones de Tritón X-100 y cromatografía en DEAE- y DNA-celulosa. AE=54 U(H) (33). -A partir de células tratadas con tolueno y lisadas por presión. Solubilización con Tritón X-100. Purificación por cromatografía en DEAE- y fosfoceululosa. EA=96 U. (H) (35). -Purificación con DEAE- y fosfoceululosa. AE=425 U. (H) (9).	9, 21, 29, 33, 41, 184, 185.
DNA Polimerasa II	E. coli Pol ⁺ (36)	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde	-DNA con roturas de cada una sencilla (DNA tratado con nucleasas III) (9, 21). -DNA con roturas simples de baja actividad (9). -No utiliza poli (dA-dT) (41, 184). -DNA desnaturado (33). -Requiere mínimo de extremo iniciador con grupo (3')-OH (9).	120	100 (9, 41) 17 (184)	50 (10, 184)	-Síntesis de DNA en dirección 5'→3' sin iniciación de nuevas cadenas (9). -Actividad exonucleolítica sobre DNA de cadena sencilla desde extremo 3'. No cataliza hidrólisis de DNA desde extremo 5' (10, 184, 185). -Cataliza pirofosforólisis de DNA y el cambio de PPI en las dNTP (184).	-Homogeneidad por electroforesis en gel de poliamicamida. -Separable de Polimerasa I, por cromatografía en DEAE celulosa o por sedimentación en gradiente de Glicerol (184). -Act. esp. de enzima es menor del 10 % de la DNA Polimerasa I (9). -Susceptible de inhibición sulfidrica. -Insensible a inhibición por antisuero contra Polimerasa I. -Distintamente más sensible f Polimerasa I a inhibición por Sales (9). -No estimulada por ATP.	-Purificación de extractos celulares en prensa francesa con Glicerol (21) AE=30(++) -Solubilización de actividad con complejo neutro de DNA con altas concentraciones de Tritón X-100 y cromatografía en DEAE- y DNA-celulosa. AE=54 U(H) (33). -A partir de células tratadas con tolueno y lisadas por presión. Solubilización con Tritón X-100. Purificación por cromatografía en DEAE- y fosfoceululosa. EA=96 U. (H) (35). -Purificación con DEAE- y fosfoceululosa. AE=425 U. (H) (9).	9, 21, 29, 33, 41, 184, 185.
		dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde	-DNA con roturas de cada una sencilla (DNA tratado con nucleasas III) (9, 21). -DNA con roturas simples de baja actividad (9). -No utiliza poli (dA-dT) (41, 184). -DNA desnaturado (33). -Requiere mínimo de extremo iniciador con grupo (3')-OH (9).	120	100 (9, 41) 17 (184)	50 (10, 184)	-Síntesis de DNA en dirección 5'→3' sin iniciación de nuevas cadenas (9). -Actividad exonucleolítica sobre DNA de cadena sencilla desde extremo 3'. No cataliza hidrólisis de DNA desde extremo 5' (10, 184, 185). -Cataliza pirofosforólisis de DNA y el cambio de PPI en las dNTP (184).	-Homogeneidad por electroforesis en gel de poliamicamida. -Separable de Polimerasa I, por cromatografía en DEAE celulosa o por sedimentación en gradiente de Glicerol (184). -Act. esp. de enzima es menor del 10 % de la DNA Polimerasa I (9). -Susceptible de inhibición sulfidrica. -Insensible a inhibición por antisuero contra Polimerasa I. -Distintamente más sensible f Polimerasa I a inhibición por Sales (9). -No estimulada por ATP.	-Purificación de extractos celulares en prensa francesa con Glicerol (21) AE=30(++) -Solubilización de actividad con complejo neutro de DNA con altas concentraciones de Tritón X-100 y cromatografía en DEAE- y DNA-celulosa. AE=54 U(H) (33). -A partir de células tratadas con tolueno y lisadas por presión. Solubilización con Tritón X-100. Purificación por cromatografía en DEAE- y fosfoceululosa. EA=96 U. (H) (35). -Purificación con DEAE- y fosfoceululosa. AE=425 U. (H) (9).	9, 21, 29, 33, 41, 184, 185.

(+) Dependiendo del molde utilizado, dado en nucleótidos/min., molécula DNA Polimerasa.
(++) 1 U. = Incorporación de 10 n mol. de nucleótido a fracción ácido insoluble durante 30' a 37°C.

Nom- bre	Origen	Requie- rimien- tos.	Molde	Daltons PM 10^{-3}	Núm. molécul as cō- lula.	Velo- cidad sinte- sis(+)	Tipos actividades	Características	Características sobresalientes método aisla- miento.	Citas
DNA Polimerasa III	E.coli pol AI-	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , etanol molde, mercap- totanol (10) o compues- tos sul- fidrili- cos.	-DNA "nativo" -El molde más activo: DNA degradado parcialmente por acción secuencial de DNasa I y Exonuclea- sa III (10, 9). -No utiliza DNA decheheli- coidal DNA de cadena sencilla o DNA con rotu- ras simples. -Requiere un extremo ini- ciador.	140 (10)	10 (10)	15.10 ³ (M) (10)	-Actividad polime- rizante en direc- ción 5'→3' sin que sea capaz de iniciar nuevas ca- denas (10). -Actividad nucleoe- lítica sobre DNA de cadena sencí- lla desde el ex- tremo 3' (10).	-Insensible a an- tisucero contra Polimerasa I. -Difere de las Polimerasas I y II en propie- dades enlazante a DEAP- y fosfo- celulosa, sensi- bilidad a inhibi- ción por sales. o N-etil malei- mida e inactiva- ción por calor. -Se inhibe por compuestos sul- fidrili- cos. -Pureza 33 % (10).	-Purificación de extractos celu- lares por cromatografía-DEAE celulosa, preci- pitación con nueva cromatogra- fía en DEAP- y fosfocelulosa.	9, 10, 41-43
DNA Polimerasa Pol G	E.coli pol G (34) (mutan- te sen- sible a sul- fato de mo- tilme- tano)	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde	-DNA "nativo" -No utiliza pol (da-dt)				-Actividad poli- merizante en dirección 5'→3'	-Sensibilidad anormal a tempe- ratura elevada. -Mayor afinidad por fosfocelulosa que Polimerasa I. -No se inhibe por antisucero contra Polimerasa I. -Parece forma ac- tivada de Poli- merasa I		44

(M) Medida a 30°C.

Nombre	Origen	Requerimientos	Molde	Daltons PM 10^{-3}	Núm. moléculas/célula.	Velocidad síntesis(+)	Tipos actividades	Características	Características sobresalientes método aislamiento.	Citas
Sistema complejo membrana	E.coli Pol ⁺	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde ATE por actividad óptima.		140		1-5.10 ⁵ (*)	-Actividad polimerizante de DNA.	-Inhibición frente a sulfidril. -Destrucción de la actividad por incubación con Dnasa (45, 46).	-Lisis de esfenoplastos preparados suavemente.	33, 46, 47 51-53
	E.coli Pol A-							-No actividad termo sensitiva para la síntesis de DNA (12)		28, 45-47, 55
	E.coli con mutaciones termo sensitiva para síntesis de DNA						-Realiza acontecimientos de una infección normal. Inhibición de síntesis de DNA del huesped, reemplazamiento por síntesis de DNA T4 (53)			12
	E.coli infectado con T4									53

(*) Medida en nucleótidos incorporados por minuto y por célula.

Nom- bre	Origen	Reque- rimien- tos	Molde	Daltons PH 10^{-3}	Núm. molécu- las/cé- lula.	Velo- cidad sinte- sis(+)	Tipos actividades	Características	Características sobresalientes método aisla- miento.	Citas
Sistema célula permeable	E. coli Pol ⁻	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg ⁺⁺ molde				1-5.10 ⁵ (m)	Actividad polime- rizante el DNA.	-Células intactas piropermeables a gran cantidad de compuestos inclu- yendo los dNTP.	-Tratamiento de células con to- lueno o éter.	29, 48-50
	E. coli pol ⁺ endo 1 ⁺	ATP para actividad óptima. Requeri- miento de K ⁺ si se realiza						-La incubación con DNasa incrementa la actividad (12)		140, 186
	E. coli con mu- tacio- nes termo- sensi- tivas para sinte- sis de DNA.	la sínte- sis, pre- sencia de TRITON X-100 (186)						-Actividad termo- sensible para la síntesis de DNA.		12
	E. coli infec- tado con T4						Realiza aconteci- mientos de infec- ción normal. Inhibición de sín- tesis de DNA del huesped, reempla- zamiento por sín- tesis de DNA T4 (53).			12

(2) Medida en nucleotidos incorporados por minuto y por célula.

Nombre	Origen	Requisitos	Modelo	Daltons	Tipos actividades	Características	Características sobresalientes método de aislamiento.	Ci
DNA Polimerasa E. coli	E. coli salvaje.	dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Hg ⁺⁺ molde	DNA "nativo" (18)	10-20 40-50 75-85 100-120 (18, 59, 63).	<p>- Los Polimerasas de PM más bajas no tienen actividad exonucleasica (18).</p> <p>- Las especies moleculares de bajo PM tienen tendencia a la agregación (18).</p> <p>- Todas las especies moleculares catalizan la polimerización, aunque se desconoce si su mecanismo es exactamente el mismo.</p>	<p>- No se sabe si las distintas especies moleculares son artefacto de aislamiento (18).</p> <p>- Creencia de que el fragmento de PM 100-120.103 es análogo a Polimerasa I (18).</p> <p>- Sospecha de que en aislamiento Polimerasa I (32) se eliminan las especies moleculares pequeñas.</p>	<p>- Purificación de extractos celulares por centrifugación a lata velocidad, tratamiento con DNasa, precipitación con sulfato amónico y cromatografía en gel de DNA- acrilamida o en DEAE celulosa (18, 60).</p> <p>- Las distintas fracciones se separan por:</p> <p>a) Sedimentación en gradiente de densidad de sacarosa (18).</p> <p>b) Filtración sobre Sephadex G-100.</p> <p>c) Electroforesis en gel de acrilamida.</p>	18 59 60
DNA Polimerasa T2	E. coli infectado con T2	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Mg ⁺⁺ molde etanol (26)	<p>- DNA desnaturado como molde más activo (26).</p> <p>- DNA de bajo ϕ x 174 de cadena sencilla.</p>		<p>- Actividad polimerizante en dirección 5' 3'.</p>	<p>- No inhibible por antisuero de la Polimerasa I (26).</p> <p>- Inhibible por antisuero de DNA Polimerasa I2, que no inhibe a la Polimerasa I.</p> <p>- Inhibible por p-cloromercuribenzoato.</p>	<p>- Purificación por precipitación con sulfato de estreptomycin, tratamiento con DNasa, fraccionamiento con sulfato amónico y cromatografía en SEAE- y fosfoceulosa.</p>	20 22 51
DNA Polimerasa T4	E. coli infectado con T4	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Hg ⁺⁺ molde	<p>- DNA de cadena sencilla con posibilidad de apareamiento aunque sea un corto fragmento de algunos nucleotidos (27).</p> <p>- Punto de iniciación de síntesis: extremo (3')-OH apareado por algunos nucleotidos a una cadena larga que sirve de molde (27, 69).</p>		<p>- Actividad exonucleolítica en dirección 3' 5' produciendo 5'-mononucleotidos (37, 71).</p> <p>- No posee actividad exonucleolítica en dirección 5' 3' (27).</p>			27 37 53 56 69 18 19

Nombre	Origen	Requerimientos	Molde	Tipo actividades	Características	Citas
DNA Polimerasa M. luteus	M. luteus	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde (112)	-DNA con roturas simples (112). -DNA desaturado.	-Actividad polimerizante. -Actividad exonucleásica 5' → 3' baja (1% de la actividad polimerizante) (113). -Actividad exonucleásica 3' 5' sobre DNA de cadena sencilla (113).	-La fracción obtenida después de cromatografía en hidroxilapatita posee un 70% de pureza (electroforesis en Gel de poliacrilamida (22, 112)).	22, 110-113
DNA Polimerasa de B. subtilis.	B. subtilis (salvaje) B. subtilis pol A5, mutante deficiente en DNA Polimerasa I	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde (23)	-DNA desaturado. -DNA con roturas simples (23). -DNA doble cadena con roturas simples (115).	-Actividad polimerizante en dirección 5' → 3'. -No posee actividad nucleolítica (23, 111). -Actividad polimerizante menor que la Polimerasa aislada de células salvajes.	-No inhibible por sulfidrilos. -Se utilizan extractos celulares parcialmente purificados en gradiente de CsCl	23, 68, 114, 115
DNA Polimerasa.	Tetrahymena pyriformis.	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , K ⁺ , molde. (116, 117)	-DNA doble cadena. -DNA desaturado considerado el mejor molde (118).	-Actividad polimerizante. -Actividad exonucleolítica (118).	-Se utilizan fracciones parcialmente purificadas. -Cuando se irradian previamente las células con U.V. se obtienen dos actividades polimerizantes distintas (118).	116, 118
DNA Polimerasa.	Embrión de erizo de mar Strongylocentrotus franciscanus y S. purpuratus.	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde.	-DNA doble cadena más efectivo que DNA desaturado. -DNA con roturas simples es el molde más activo.	-Actividad polimerizante termolabil. Estabilizable por la presencia de poliglicoles. -No tiene actividad nucleolítica.	-El aislamiento de realiza bien a partir de muchos, bien a partir de células enteras sin que se observen diferencias de rendimiento.	119, 120
DNA Polimerasa de timo.	Células de timo de ternera.	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Mg ⁺⁺ , molde. Ha sido descrito requerimiento de ATP (19);	-DNA Timo "nativo" (24). -DNA Timo desaturado. -Homopolímeros sintéticos (19) en presencia de oligonucleótidos complementarios como iniciador. -DNA tratado con DNasa (19).	-Actividad sintetizante de DNA.	-El PPI inhibe la síntesis (24). -Fuerzas iónicas superiores a 0.1M inhiben la síntesis.	19, 24, 65, 121-125

Nombre	Origen	Requerimientos	Molde	Tipos actividades	Características	Citas
DNA Polimerasa dependiente de RNA	Células de hígado de rata en 2 ^a generación	dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Mg ⁺⁺ , molde Puede utilizar los dNMP si se utilizan extractos "crudos" celulares (132).	-DNA Timo "nativo". -DNA desnaturado. -DNA preincubado con sobrenadante del extracto de hígado de rata en regeneración (132). -DNA tratado con DNasa I.	-Actividad polimerizante baja si se lo compara con la DNA Polimerasa I de E.coli.	-Purificación parcial. No homogeneidad.	25, 132-134
DNA Polimerasa de ascitos Ehrlich	Células de tumor ascitos Ehrlich	dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Mg ⁺⁺ , molde	-DNA de cadena sencilla (desnaturado) (126). -Se incrementa la actividad por adición de oligonucleotidos con extremos (3')-OH (126) -Se inhibe por adición de oligonucleotidos con extremos (5')-OH y (3')-P (126).	-Actividad polimerizante de DNA. -Exenta de actividad exonucleásica (127).	-Obtenida por choque hipotónico de las células y purificada parcialmente (127).	126, 127 128, 129, 131 130
DNA Polimerasa de tumor Walker	Células de tumor Walker	dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Mg ⁺⁺ , molde (135)	-DNA doble cadena con extremos (3')-OH (135) -DNA conteniendo roturas simples. -No utiliza RNA o híbrido de RNA-DNA (135).	-Actividad polimerizante de DNA. -No tiene actividad de nucleasa. -Bajo nivel de actividad exonucleásica (1-2 % de la actividad polimerásica) (135). -Parecida en su comportamiento a la DNA Polimerasa II de E.coli.	-Se han aislado tres DNA Polimerasas. Dos de ellos, la polimerasa citoplasmática y la nuclear N1, han sido muy purificadas hasta aparente homogeneidad. La tercera, la polimerasa nuclear N2, parcialmente purificada, solo se parece a la Polimerasa citoplasmática en sus propiedades físicas (135).	135, 136
DNA Polimerasa dependiente de RNA	Virus de leucemia, sarcoma y tumores mamarios.	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Mg ⁺⁺ o Mn ⁺⁺ , un reactivo sulfidrico, molde.	-RNA (74 - 78). -Híbrido DNA-RNA (82, 88-91). -DNA (96, 97). -Polímeros sintéticos: vibo-, desoxiribonucleosidos, híbridos poli(rA). poli(rU) y poli(rA). poli(dT) (109).	-Cualquiera que sea el molde (RNA, DNA, o híbrido de las dos) polimeriza DNA de bajo PM (88, 96, 98). -No cataliza la incorporación de vibo nucleotidos (84, 101).	-Obtenible por solubilización con detergentes no iónicos (95). -No se han descrito purificaciones. No está claro si las distintas actividades son debidas a una o más enzimas (92, 93).	61, 74-109

merasa I. Aunque, inicialmente esta segunda enzima fué aislada a partir de bacterias deficientes en DNA Polimerasa I, (*E. coli* pol A⁻), ha sido confirmada su presencia en células *E. coli* Pol⁺ por Moses y Richardson⁽³⁶⁾, quienes emplearon las diferencias de enlace de las Polimerasas I y II a DEAE- y fosfocelulosa para purificar la Polimerasa II de células Pol⁺. Las preparaciones de Polimerasa II a partir de células pol A⁻ y Pol⁺ no son distinguibles⁽¹²⁾ en sus propiedades y características. Las diferencias de actividad que presentan las preparaciones según las diferentes publicaciones pueden ser atribuibles al molde utilizado en el ensayo de actividad: Hoses y Richardson utilizaban DNA con roturas simples en las cadenas^(35,36), Kornberg y Gefter, utilizan DNA con largos trozos de cadena sencilla^(9,21), apareciendo para ambos grupos poco activa frente a DNA desnaturalado. Sin embargo, contrariamente a estos resultados, las preparaciones de Knippers⁽³³⁾ presentan poca actividad utilizando DNA con roturas simples, siendo mas activas con DNA desnaturalado, por lo que resulta mas parecida a la Polimerasa de fago T4 en sus requerimientos de molde^(27,37,38).

La DNA Polimerasa II da cuenta del 5-10% de la actividad total de las células Pol⁺, del 20% de la capacidad sintetizante de DNA de las células tratadas con tolueno⁽³⁶⁾ y de solo una parte de la actividad sintética de las células permeables pol A⁻ o de los complejos DNA-membrana⁽⁴⁰⁾. Aunque la DNA Polimerasa II es en el presente el foco lógico de atención como una de las enzimas responsables de la replicación cromosómica en *E. coli*, tampoco aparece claro su papel, ni su preponderancia o no sobre el de la DNA Polimerasa I.

Algunas de las observaciones concernientes a la Polimerasa I, que han hecho dudar respecto a su partici-

pación en la replicación del cromosoma, pueden ser aplicables también a la Polimerasa II. Los estudios realizados sugieren que la enzima realiza la reparación de trozos de cadena de DNA, actúa en las roturas simples, no parece iniciar nuevas cadenas, requiere un grupo (3')-OH, sintetiza en dirección 5' a 3' y es menos activa que la DNA Polimerasa I con los sustratos empleados, ya que posee aproximadamente $\frac{1}{500}$ de la actividad específica de la Polimerasa I^(9,21,33,35). Ninguna de estas características hacen de ella una enzima de la replicación, sino más bien una enzima de la reparación.

Hasta ahora no ha sido encontrado defecto en DNA Polimerasa II en ninguna de los mutantes de E. coli estudiados⁽¹²⁾.

La purificación del sistema enzimático soluble que cataliza la síntesis de DNA, a partir del mutante de De Lucia y Cairns deficiente en DNA Polimerasa I, E. coli pol A⁻, ha conducido al aislamiento, conjuntamente con el de la DNA Polimerasa II, de una tercera enzima de características y propiedades no identificables con ninguna de esas dos enzimas (ver cuadro 1), por lo que ha sido denominada DNA Polimerasa III^(9,10,41-43). El análisis de mutantes de E. coli con mutaciones termosensitivas para la síntesis de DNA y para la viabilidad de la célula parecen indicar que la DNA Polimerasa III es esencial para la replicación del DNA^(42,43) ya que mientras la DNA Polimerasa III aparece alterada en estas cepas, las Polimerasas I y II aparecen normales, lo cual indica, al menos, una cierta independencia entre estas enzimas.

Aunque de las tres enzimas es la que menos moléculas presente por célula (ver cuadro 1), su velocidad de síntesis, sin embargo, es mucho mayor que las catalizadas por las Polimerasas I y II, medidas en sus condiciones óptimas.

tima de actuación, hasta el punto de poder afirmar que la actividad total de la Polimerasa III da cuenta suficientemente de la velocidad "in vivo" de la replicación (10). Sin embargo, también se le puede objetar a esta enzima algunas de las observaciones hechas a las otras dos como enzimas de la replicación cromosómica, ya que al igual que ellas no parece iniciar nuevas cadenas, actúa sobre las roturas simples reparando trozos de cadena de DNA, requiriendo siempre un extremo iniciador (9, 10).

Se ha purificado una cuarta actividad polimerásica de DNA a partir de células pol G, un mutante de E. coli, sensible a sulfonato de metilmetano, aislado por De Lucia y Cairns (34). Los extractos de pol G contienen una actividad polimerásica que es aproximadamente la quinta parte de la existente en las células Pol⁺ (44). Aunque presente propiedades diferentes que la Polimerasa I, parece que es una forma alterada de esta enzima, ya que es inhibible por el antisuero contra la Polimerasa I.

Por lo que venimos comentando, se puede observar que el problema de las enzimas implicadas en la replicación de DNA es mucho más complejo de lo que pareció en un principio. La investigación en este campo ha seguido un círculo, ya que habiéndose desarrollado utilizando desde extractos celulares hasta enzimas purificadas, hasta completa homogeneidad, vuelve ahora a la búsqueda de nuevo del sistema enzimático a partir de los "crudos" celulares. En este sentido se puede hablar de la actividad sintetizante del sistema complejo membrana (45-47) o de la utilización de células anormalmente permeables para la síntesis de DNA (29, 48-50).

Se ha encontrado que fracciones del aislamiento de la membrana a partir de bacterias (51, 52) y de E. coli

infectado con fagos^(53,27,20,54), catalizan la síntesis de DNA. Los experimentos realizados^(5,53) sugieren que la actividad polimerizante de las fracciones de aislamiento de la membrana difieren de la actividad normal encontrada en los componentes solubles de los extractos celulares, incluso cuando se utiliza el mutante de eficiente en DNA Polimerasa I^(28,46).

Por otra parte, al tratar células de E. coli con tolueno o éter se obtienen células que aparecen intactas pero son permeables a gran cantidad de compuestos, incluyendo los nucleosidos trifosfato. Estas células son incapaces de dividirse, pero pueden realizar funciones de síntesis de DNA, RNA o proteína si se les proporciona los precursores apropiados.

Aunque originalmente se estudiaron las actividades sintetizantes de los sistemas complejo membrana y células permeables en células Pol⁻, ha podido ser demostrada su actividad también en las células Pol⁺. El complejo de membrana y DNA obtenido a partir de las células Pol⁺ ha sido observado suficientemente libre de Polimerasas, apareciendo solo la actividad asociada a la membrana^(33,46,47).

Ambos sistemas presentan diferencias. Como podría ser esperado, hay mayor parecido de las células permeables con las células no tratadas. La síntesis de DNA utilizando las células permeables continúa durante al menos 1 hora, en contraste con el complejo membrana^(29,48) en el cual la síntesis se amaigüa después de aproximadamente 2 minutos de incubación^(45,46). Sin embargo, modificando el procedimiento se pueden obtener mayores períodos de actividad para el complejo membrana⁽⁵⁵⁾.

Las velocidades de síntesis de DNA catalizada por ambos sistemas son dos órdenes de magnitud superior que la producida "in vitro" con la DNA Polimerasa I, siendo comparables con las velocidades de polimerización observados "in vivo". Sin embargo, y a pesar de estos in tentos, queda incierto el papel de estos complejos, aunque experiencias realizadas por el grupo de Okazaki^(15, 23,47,56,57) encuentran cortos fragmentos de DNA sintetizados asociados a la membrana.

Por otra parte, Cavalieri y colaboradores han ais lado varias especies moleculares de DNA Polimerasa a partir de células de E. coli^(18,58-64). Las distintas especies se diferencian en su peso molecular, oscilante para ellos entre 10.000 y 120.000 Daltons. Parece que las especies de peso molecular comprendido entre 100.000 y 120.000 Daltons son análogas a la DNA Polimerasa I⁽¹⁸⁾ y se sospecha^(8,65) que las restantes especies moleculares de peso molecular menor derivan de la DNA Polimerasa I por degradación durante el aislamiento, aunque se postule⁽¹⁸⁾ que los tamaños moleculares mayores son debidos a agregación de unidades de peso molecular pequeño consigo mismas o con otras moléculas, como por ejemplo, exonuclea sas. Esto último justificaría las distintas actividades que suelen presentar las especies de peso molecular mayor. Otros grupos han detectado la existencia en E. coli de algunas especies moleculares de pesos moleculares dis tintos^(58,67) que poseen características similares a los fragmentos obtenidos por proteólisis de la DNA Polimerasa I^(67,68), que confirman la sospecha de que se produzca la proteólisis de la enzima durante el proce so de ais lamiento, o quizás aún "in vivo"⁽⁶⁷⁾.

Si hay confusión sobre las distintas actividades sintetizantes de DNA aislables a partir de E. coli, uno de los microorganismos mas estudiados en este sentido,

mayor dificultad aparece cuando se intenta hacer estudio comparativo de las DNA Polimerasas aislada de otros organismos. Muy próximas a las Polimerasas descritas hasta ahora son las DNA Polimerasas T₄^(27,37,53,69-73) y T₂^(20,26,54) aisladas a partir de células de E. coli infectadas con fagos T₄ y T₂ respectivamente. La DNA Polimerasa T₄ posee características muy próximas a la DNA Polimerasa II, diferenciándose de la Polimerasa I en su falta de actividad exonucleolítica capaz de degradar al DNA en dirección 5'→3'⁽²⁷⁾.

Las restantes enzimas catalizantes de la polimerización de DNA que han sido mas estudiadas hasta ahora tienen diversos orígenes: algunas proceden de otras bacterias (DNA Polimerasa de Micrococcus luteus^(22,110-113), DNA Polimerasa de Bacillus subtilis^(23,68,114,115), DNA Polimerasa de Tetrahymena pyriformis⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾), otras de organismos superiores (DNA Polimerasa de embrión de erizo de mar^(119,120), de mamíferos: DNA Polimerasa de Timo^(19,24,65,121-125), DNA Polimerasa de hígado de rata^(25,132-134), bastantes Polimerasas han sido aisladas de células tumorosas⁽¹²⁶⁻¹³¹⁾ o células KB humanas^(135,136). Una DNA Polimerasa destacable por sus requerimientos especiales de molde es la Polimerasa dependiente de RNA, aislada a partir de virus de leucemia, sarcoma y tumores mamarios^(61,74-109). Esta enzima cataliza la síntesis de DNA, recibiendo información de un molde que puede ser tanto un DNA como un RNA, como un híbrido de ambos^(88,96,98). Resulta difícil hacer estudio comparativo sobre las características comunes y diferencias de las distintas DNA Polimerasas aisladas. Sin querer hacer un estudio exhaustivo, presentamos en el cuadro 1 un resumen de ellas.

I.1.3. DNA POLIMERASA I.

De entre todo el conjunto de enzimas polimeri-

zantes de DNA que han sido descritas hemos utilizado para nuestro estudio la DNA Polimerasa I, -aislada según el método de Jovin et al.⁽³²⁾ a partir de extractos solubles de E. coli salvaje-, por ser la polimerasa que mas minuciosamente ha sido estudiada en todas sus propiedades y características, tanto sobre el mecanismo de actuación en la polimerización, como sobre su unión al DNA que copia y a los monómeros que utiliza en la polimerización, las desoxinucleosidos trifosfato de adenina, citosina, timina y guanina.

La DNA Polimerasa I de E. coli es una cadena polipeptídica sencilla de peso molecular 109.000 que cataliza varias diferentes reacciones^(8,32). Además de su acción polimerásica con formación de enlaces fosfodister, la enzima cataliza la reacción de cambio de pirofosfato en los desoxiribonucleosidos trifosfato y la rotura de enlaces fosfodister del DNA, bien por pirofosforolisis, bien por hidrolisis exonucleásica^(148,149,159). Hay dos distintas reacciones exonucleolíticas catalizadas por la Polimerasa I: una degrada al DNA en dirección 3' a 5' (es la actividad denominada exonucleasa 3'→5) y la otra lo degrada en dirección 5' a 3' (la denominada exonucleasa 5'→3')⁽¹⁴⁹⁾.

I.1.3.1. Función de la DNA Polimerasa I.

Kornberg ha resumido la información sobre la acción de la DNA Polimerasa I, especulando sobre su posible papel en la replicación cromosómica⁽⁸⁾.

Se han utilizado hasta ahora diferentes clases de evidencias para sostener u oponer la visión de que la DNA Polimerasa I de E. coli es la enzima que realiza la replicación del cromosoma "in vivo"^(34,137). Los es-

tudios realizados con mutantes deficientes en Polimerasa I han ayudado a resolver parte de esta controversia. La pequeña pero medible actividad polimerásica del mutante pol A1⁻ permitió durante algún tiempo la especulación sobre si la actividad residual, atribuida entonces a la Polimerasa I, juega algún papel en la replicación del organismo intacto. La demostración de que parte o toda esa actividad es debida a la Polimerasa II⁽⁹⁾, elimina la mayor parte de esta duda, aunque no totalmente. Sin embargo, con la evidencia de que pol A es el gene estructural para la DNA Polimerasa I⁽⁴⁴⁾, se podría excluir la posibilidad de que esta enzima sea requerida para la replicación mostrando que la "borradura de ese ~~gene~~ no interfiere con la replicación⁽¹²⁾". Pero aún en el caso de que no sea requerida para la replicación, resultaría difícil excluir su participación en ella cuando está presente. Kingsbury y Helinski⁽¹³⁸⁾ prueban con sus estudios que la DNA Polimerasa I es necesaria para la replicación del factor colicinogénico Col E1. Aunque los resultados obtenidos por ellos sugieren que es utilizada la función de la Polimerasa I en la replicación del Col E1, no se distingue claramente si su papel es directo o no, como podría ser, por ejemplo, por la provisión de una función de reparación adicional.

Los argumentos mas fuertes atestiguando en contra del papel de la Polimerasa I en la replicación, proceden de estudios genéticos en E. coli y B. subtilis. Ha sido posible aislar en estos dos microorganismos una serie de mutantes condicionalmente defectivos en replicación de DNA⁽¹³⁹⁻¹⁴⁵⁾ en los que no se ha encontrado alterada la actividad Polimerasa I cuando se ensayaban normalmente los extractos celulares.

Además, el "locus" genético que parece que codifica a la Polimerasa I es distinto de los genes para las en

zimas que se ha demostrado se requieren en la replicación⁽²⁾.

Aparte de un posible pero no probado papel en la replicación, se ha sugerido para la DNA Polimerasa I una función en la reparación de DNA, sugerencia a la que se ha llegado tanto por estudios "in vitro" como "in vivo". Ha sido muy estudiada la capacidad de la enzima para reparar trozos unihelicoidales en DNA "in vitro"^(8,137,146). Esta enzima posee características de actuación "in vitro" que le hacen idónea para una función de reparación, como son: a) la actividad exonucleolítica que presenta asociada con la polimerásica^(37, 147,148) capaz de degradar al DNA en dirección 3' a 5', y de eliminar dímeros de timina⁽¹³⁾; b) la actividad exonucleolítica, capaz de degradar al DNA molde en dirección 5' a 3', de actuación simultánea con la polimerásica y que produce como resultado el desplazamiento del punto de unión de la enzima al DNA, una rotura simple en una de las cadenas del molde⁽¹⁴⁹⁾, según lo cual esta única enzima, gracias a sus dos actividades simultáneas llevaría a cabo dos de las etapas propuestas^(150,151) en la reparación de la lesión ultravioleta en DNA, y c) la habilidad de la DNA Polimerasa I de actuar concertadamente con la ligasa para reestablecer la continuidad de la cadena⁽¹⁵²⁾.

El defecto "in vivo" de la enzima en los mutantes pol A⁻ apoya también la función de la Polimerasa I en la reparación de DNA⁽³⁴⁾, ya que estos mutantes son sensibles a las radiaciones ultravioletas y a sulfonato de metilmetano. El mutante pol A1⁻ no parece ser defectivo en la recombinación⁽³⁹⁾, mecanismo utilizado para la corrección de la lesión ultravioleta^(150,153). Como la sensibilidad ultravioleta, causada por las mutaciones uvrA y pol A no son aditivas en un mutante doble

(39), esto quiere decir que la Polimerasa I actúa seguramente en la vía excisión - reparación uvr; sin embargo, no ha sido todavía definido su papel preciso en esa vía.

Parece que las células E. coli pol A⁻ pueden realizar la excisión de los dímeros de timina, lo cual ha sugerido que el defecto ultravioleta de estos mutantes estaría en las etapas posteriores de la reparación, como, por ejemplo, en la de reemplazamiento de los huecos producidos al eliminar los dímeros⁽¹⁵⁴⁾. Varias de las propiedades de las células pol A⁻ están de acuerdo con estas suposiciones: a) la respuesta mutagénica normal a la irradiación ultravioleta⁽¹⁵⁵⁾; b) el número incrementado de roturas que permanecen en el DNA después de la irradiación ultravioleta⁽¹⁵⁶⁾; y c) la disminución de la habilidad para convertir el DNA sintetizado "de novo", de bajo peso molecular, en DNA de peso molecular alto⁽¹⁵⁷⁾.

Resumiendo, la DNA Polimerasa I parece tener un papel facultativo en la reparación de DNA, resultando evidente que su función sería la de llenar los huecos producidos por la eliminación de los dímeros, cosa que estaría de acuerdo con su actividad sintetizante "in vitro". No parece haber evidencia de que la actividad exonucleolítica eliminadora de dímeros de la enzima sea utilizada "in vivo", pero esto puede ser solo debido a la alta eficacia de otra enzima alternativa que tenga esta capacidad⁽¹²⁾. Parece virtualmente excluido un papel obligatorio de la Polimerasa I en la replicación de DNA; permanece la posibilidad de un papel facultativo, pero hasta el momento faltan evidencias directas para apoyarlo.

I.1.3.2. Estructura y Composición.

El peso molecular tan alto y la presencia simultánea de actividades polimerásica y exonucleásicas en la DNA Polimerasa I, sugieren una estructura en subunidades para ella. Sin embargo, el peso molecular medido por sedimentación en equilibrio bajo condiciones desnaturantes y reductoras ha resultado ser el mismo que el de la proteína nativa, aunque por dispersión óptica rotatoria y por estudio de velocidad de sedimentación se haya deducido que la enzima pierde su estructura ordenada en esas condiciones, por lo que se podría esperar que estuviese completamente dissociada⁽³²⁾. Más del 95% de la proteína emigra como una única banda en electroforesis en gel de poli-acrilamida, incluso a pH extremos y en condiciones desnaturantes, lo cual llevaría a pensar⁽⁸⁾ en una estructura única de cadena polipeptídica sencilla o bien en subunidades idénticas. Sin embargo, ha sido descartada la posibilidad de múltiples subunidades idénticas por el hecho de que la enzima contiene, para el peso molecular 109.000, un solo grupo sulfhidrilo y un solo puente disulfuro. El grupo sulfhidrilo puede ser modificado con yodoacetato o ion Hg^{2+} dando derivados con completa actividad tanto exonucleásica como polimerásica⁽¹⁶⁰⁾. La reacción de la enzima con $^{203}\text{Hg}^{2+}$ ha proporcionado un método para marcar la enzima, necesario para el estudio del complejo DNA-enzima⁽³²⁾.

La Polimerasa I posee aproximadamente 1000 aminoácidos por molécula, sin que haya evidencia de la existencia de algún grupo prostético⁽⁸⁾. El residuo amino terminal es metionina.

Aunque las experiencias citadas⁽³²⁾ hayan llevado a la idea de una cadena polipeptídica sencilla, existe la posibilidad de que existan subunidades unidas por

12

enlaces no peptídicos que resisten las condiciones desnatu-
rantes y reductoras o los pH extremos. Hemos comentado
(pág.) algunos trabajos realizados sobre preparaciones
de DNA Polimerasa de E. coli en las que se llega a valores
de peso molecular muy pequeños y que han sido designados
por subunidades por Cavalieri⁽⁶⁰⁾ y Cezius⁽⁵⁹⁾ aunque sus
preparaciones son de relativamente baja actividad especí-
fica⁽⁸⁾.

Las alteraciones químicas de la enzima han propor-
cionado conclusiones importantes a cerca de su estructura
y función⁽¹⁶⁰⁾. La modificación del grupo sulfidrilo no al-
tera ninguna de sus actividades, lo que ha permitido pen-
sar que este grupo está alejado del centro activo. Un deri-
vado con grupos N-Carboximetilo lisatoil no posee activi-
dad polimerásica, pero incrementa enormemente la actividad
nucleásica⁽⁸⁾. Estudios cinéticos y de enlace realizados
⁽⁸⁾ indican que el efecto mayor de esta alteración se mani-
fiesta en la afinidad de las desoxinucleotidos trifosfato
a la enzima, lo cual ha hecho pensar que posiblemente al-
guno de los 61 residuos lisina de la enzima esté localiza-
do en el centro activo para los sustratos y que su oscila-
ción altera la función de este sitio. El incremento simultá-
neo de la actividad nucleásica implica que esa altera-
ción lleva consigo cambios en la interacción DNA-enzima
⁽⁸⁾.

I.1.3.3. Centro activo.

De los estudios realizados parece que se deduce
que todas las funciones catalizadas por la enzima se de-
sarrollan y se orientan en un solo centro activo. Se han
considerado diversos modelos para describir este centro
activo^(8,161-164). El modelo propuesto por Beyersmann et

al. (161), basado exclusivamente en datos cinéticos, propone un sitio idéntico para pirofosforolisis e hidrolisis y un centro activo para las funciones de degradación y polimerización de la enzima; este modelo propone también la pirofosforolisis de cadenas que posean extremos (3')-fosfato y papeles para los inhibidores específicos que no están de acuerdo con la experimentación presentada por Kornberg et al. (8). El modelo dado por Kornberg (8), aunque parece correcto en su línea básica, no puede explicar alguna de las características de la enzima, como, por ejemplo, la capacidad de la enzima para distinguir una estructura secundaria tanto en la actividad polimerizante como en la nucleolítica, ^{que} requiere un reconocimiento tridimensional de las cadenas molde e iniciadora dentro del centro activo. Para acomodar la traslación de una estructura doble helicoidal a través del centro activo sería necesario en él una superficie adaptada a una o mas vueltas de la doble hélice. Además ese modelo no considera las influencias importantes de cationes específicos, fuerza iónica y temperatura sobre la actuación de la enzima. Igualmente, el modelo tendría que tener en cuenta que las enzimas y factores relacionados con las funciones celulares de la DNA Polimerasa I interaccionarán con ella, en el centro activo o cerca de él, en la regulación de estas funciones (8).

En la mayor parte de las hipótesis para construir un modelo de funcionamiento de la enzima se supone al centro activo como alguna superficie polipeptídica especialmente adaptada que puede reconocer y acomodar varias estructuras nucleotídicas. Parece evidente que dentro del centro activo tiene que haber al menos cinco sitios:

a) Un sitio para una porción de la cadena molde. Este área enlaza la cadena molde donde hay formados pares de bases en una distancia de varios nucleotidos. La cade-

na se orienta con polaridad particular⁽⁸⁾. Parece que este es el sitio donde se enlaza el DNA circular de cadena sencilla, unido a oligómeros a través de las bases; pero parece incierto el que este sitio reconozca una región bihelicoidal extendida⁽⁸⁾.

b) Un sitio para la cadena creciente, la cadena iniciadora. Esta cadena se orienta con polaridad opuesta a la del molde⁽⁸⁾.

c) Un sitio con especial reconocimiento para el grupo (3') - OH del nucleótido terminal de la cadena iniciadora, el extremo iniciador. Esta región es el sitio también para la hidrolisis y pirofosforolisis de la cadena iniciadora terminada en [(3')-OH] (hidrolisis en dirección 3' → 5')⁽⁸⁾.

d) Un sitio para el desoxinucleótido trifosfato⁽⁸⁾.

e) Un sitio adicional para la hidrolisis de la cadena terminada en un grupo fosfato en posición 5' (hidrolisis en dirección 5' → 3')⁽⁸⁾.

I.1.3.4. Separación de las actividades de la Enzima.

Klenow et al.^(58,165) y Brutlag et al.⁽⁶⁸⁾ han demostrado que la actividad polimerizante de la DNA Polimerasa I se puede separar de su actividad nucleasa 5' → 3' por rotura proteolítica limitada. Ambas actividades se recuperan en fragmentos distintos: la actividad polimerásica se presenta en el fragmento de peso molecular 75.000 Daltons y la exonucleasa 5' → 3' en el de peso molecular 35.000 Daltons; resulta interesante comtatar que ambas actividades son mayores en cada uno de

los fragmentos separados que en la enzima intacta, cuando se refieren a concentración molar. Las actividades ^{de síntesis y degradación} cambio de pirofosfato, pirofosforolisis y exonucleolítica en dirección $3' \rightarrow 5'$ permanecen asociadas a la polimerásica en el fragmento largo ⁽¹⁶⁶⁾.

La separación de las actividades catalíticas de la enzima por degradación ha ofrecido una buena oportunidad para examinar los papeles que esas actividades juegan en el complejo grupo de reacciones catalizadas por la enzima intacta. Esta fragmentación también ha permitido estudiar las actividades individuales de la enzima sin interferencia con las otras actividades. Así, estudios realizados sobre la actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ del fragmento largo indican que esta nucleasa puede servir de "corrector de pruebas", pudiendo ser su función la corrección de los errores en la polimerización ⁽¹⁶⁷⁾.

El fragmento largo aparece completamente activo en la síntesis de DNA ⁽⁶⁷⁾, así como en el cambio de pirofosfato y en la pirofosforolisis, reacciones, por otro lado, que son reconocidas como inversas de la de síntesis ^(8,148,167). En cambio no presenta actividad exonucleásica $5' \rightarrow 3'$ detectable sobre un sustrato de cadena doble, aunque sí cataliza la hidrolisis rápida de un sustrato de cadena sencilla en la dirección $3' \rightarrow 5'$ ⁽⁶⁷⁾. La falta de actividad exonucleolítica $5' \rightarrow 3'$ sugiere que la síntesis de DNA catalizada por el fragmento largo no lleva consigo hidrolisis simultánea del DNA, contrariamente a lo que ocurre en la síntesis catalizada por la enzima intacta; cuando el molde es un DNA de doble cadena con roturas simples, la síntesis catalizada por la enzima intacta presenta producción simultánea de residuos mononucleotidos, equimolecular con la polimerización ⁽¹⁴⁹⁾, representando la velocidad de hidrolisis el 70% de la de síntesis.

La mayor parte de las propiedades del fragmento largo son paralelas a las de las Polimerasas aisladas de otros microorganismos. Así las Polimerasas aisladas de *B. subtilis* (peso molecular 75.000)^(23,169), y de *M. luteus* (peso molecular 82.000)⁽¹¹²⁾, que catalizan la síntesis utilizando como molde DNA de cadena doble con roturas simples, presente muy baja, prácticamente nula, actividad exonucleolítica 5' → 3'⁽¹⁶⁸⁾. Igualmente, es similar en su falta de actividad exonucleolítica a la DNA Polimerasa inducida por el bacteriofago T4⁽⁶⁹⁾ y a la Polimerasa II de *E. coli*⁽⁹⁾. En vista de estos datos, resulta justificado pensar en la posibilidad de una proteólisis de las Polimerasas durante las etapas del aislamiento, especialmente en el caso de la de *B. subtilis*, cuyo extracto celular posee un alto contenido en proteasas. Sería interesante llegar a dilucidar si las distintas Polimerasas conocidas, aisladas por diferentes caminos, no serán fragmentos distintos, mas o menos largos, que en el sistema "in vivo" estarían unidos por enlaces sensibles a proteasas⁽⁶⁷⁾.

La mezcla de los fragmentos pequeño (peso molecular 35.000) y largo (peso molecular 75.000) de la DNA Polimerasa I recupera las propiedades de la enzima intacta, debido a la reasociación de los dos fragmentos bien sobre el DNA, o bien independiente de él, ya que el enlace de un fragmento al DNA puede o no provocar el enlace del otro fragmento adyacente a él. Como ambos fragmentos se separan por cromatografía en Sephadex o en fosfocelulosa⁽¹⁶⁵⁾, se puede pensar que la afinidad entre ellos no debe ser muy fuerte; además, por sedimentación en gradiente de sacarosa, se ha encontrado que ambos fragmentos se sedimentan separadamente⁽⁶⁷⁾ y en zonas iguales a cuando se hace la sedimentación por separado, lo cual ha llevado a concluir que los fragmentos separados no presentan afinidad física por el otro sobre DNA⁽⁶⁷⁾. Con niveles altos

de saturación referida al número de extremos 3' y 5' que presenta la muestra de DNA utilizada como molde, los dos fragmentos enlazan adyacentemente en la misma rotura simple, cada fragmento en cada uno de los extremos correspondientes de la rotura simple; sin embargo, cuando no hay saturación, parece que el enlace de un fragmento al DNA no influye en la afinidad sobre el otro fragmento y que éste se asocia al DNA al azar⁽¹⁶⁶⁾.

La rotura de la DNA Polimerasa I en dos fragmentos activos que no muestran afinidad el uno por el otro y la similaridad de sus reacciones catalíticas en las reacciones análogas catalizadas por la enzima intacta, indican que dentro de la cadena polipeptídica sencilla de la DNA Polimerasa I hay dos enzimas distintas que se mantienen unidas por unión polipeptídica (susceptible a proteólisis), lo cual asegura que tanto la función polimerasa como la exonucleasica actúen simultáneamente en los extremos correspondientes de una rotura simple en una molécula de DNA⁽¹⁶⁶⁾.

I.1.3.5. Unión al DNA.

La unión de la DNA Polimerasa I a las moléculas de DNA ha sido estudiada, a través de técnicas de centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa⁽¹⁷⁰⁾, utilizando una gran variedad de estructuras de DNA⁽¹⁷¹⁾ para analizar la influencia de la estructura del molde en su enlace a la enzima. Los DNA más estudiados han sido los siguientes:

a) El copolímero sintético alternante d(AT)₁₂. Cuando se utiliza un exceso de la enzima, el sustrato sedimenta cuantitativamente con ella, indicando una gran afinidad de enlace. Cuando, por el contrario es el oli-

gómero el que está en exceso, toda la enzima sedimenta como complejo oligómero-enzima, en cantidad equimolecular con el oligómero, indicando que la Polimerasa contiene solo un sitio para el oligómero⁽³²⁾.

b) Un DNA circular de cadena sencilla, ϕ X 174. Los experimentos que han sido realizados utilizando este DNA han llevado al cálculo de mas de 20 moléculas de enzimas enlazadas por molécula de DNA^(147,172). Sin embargo, se ha podido comprobar^(12,17,69) que es tos DNA de cadena circular sencilla están impurifica dos por trozos pequeños de oligonucleotidos, lo cual explica el número de moléculas de Polimerasa enlazadas a las cadenas sencillas.

c) Una DNA de doble cadena circular y cerrada. Cuando se utilizan estas estructuras de DNA no hay asociación con la DNA Polimerasa I⁽¹⁷³⁾.

d) DNA de doble cadena circular, cerrada, des naturado por calor para llevarlo a cadena sencilla. En este caso, el número de moléculas de Polimerasa en lazadas depende de la longitud del DNA, comportándose análogamente que el DNA viral de cadena sencilla ϕ X 174. Al igual que en ese caso, se ha comprobado la presen cia de pequeños oligómeros impurificantes⁽¹⁷³⁾.

e) Cuando se introducen roturas simples dentro del DNA circular de cadena doble o del ϕ X 174 tratándolo con DNasa pancreática, se produce la asociación DNA-enzima⁽²⁶⁾ capaz de polimerizar cuando se le añaden los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfato necesarios. El número de moléculas de enzima asociadas por molécula de DNA es igual al número de roturas simples introducidas en las moléculas de DNA, cuando se actúa en con diciones de saturación de la enzima.

f) Si las roturas simples se introducen en el DNA doble cadena por tratamiento con nucleasa micrococal, la cual hidroliza los enlaces internucleotídicos dando lugar a grupos extremos fosfato en posición 3' e hidroxilo en posición 5', se produce la asociación DNA-enzima igualmente, pero esta asociación no es apta para la polimerización cuando se agregan los desoxirribonucleosidos trifosfato necesarios ⁽¹⁸²⁾. Las moléculas de Polimerasa I son capaces de asociarse a las de DNA, en un número exactamente equivalente al número de roturas simples existentes sobre las cadenas, cualquiera que sean los grupos extremos que dejen libre la producción de esas roturas simples puesto que no se ha detectado diferencias en el enlace de la Polimerasa con sustratos que tuviesen grupos extremos (3')-OH. en las roturas simples, comparados con los que presentaban grupos fosfato en posición 3' ⁽¹⁷⁰⁾. Sin embargo, ambas asociaciones se diferencian en su capacidad polimerizante cuando se añaden los desoxinucleosidos ~~trifosfato~~ necesarios para la síntesis del polímero. X'

Los perfiles de sedimentación han mostrado que las moléculas de enzima se enlazan a las de DNA que poseen roturas en su interior y no a las regiones bihelicoidales intactas. El enlace se produce en los extremos de las roturas simples y en los extremos de cadena, así como a lo largo de cadenas sencillas. Esto último hizo sospechar si el enlace al DNA en las roturas simples o en los extremos de cadena era simplemente una consecuencía del deshilachamiento y carácter de cadena sencilla de estas regiones. Sin embargo, el descubrimiento de la necesidad de apareamiento parcial en la cadena sencilla para que se produzca la asociación con la enzima ha hecho pensar que el enlace esté dirigido mas específicamente al nucleotido terminal de una región bihelicoidal (8).

Aunque puede asociarse al DNA, la Polimerasa I no puede iniciar la síntesis ni en los extremos de un DNA lineal de cadena doble, ni a lo largo de una secuencia de nucleótidos en una hélice intacta de DNA, ni en las roturas simples de un DNA bihelicoidal cuyo grupo extremo no sea $(3')\text{-OH}$ ^(3,137,147,152,196). La distorsión local y desnaturación de una de las hélices de DNA producidas en la vecindad de un extremo de cadena no son suficientes para producir la iniciación de la síntesis, ya que la rotura simple debe contener un extremo $(3')\text{-OH}$. La polimerización ocurre entonces por extensión de la cadena iniciadora, -la que posee el grupo extremo $(3')\text{-OH}$ -, mas que por iniciación de nuevas cadenas ⁽⁸⁾. El polímero producido aparece unido covalentemente a la cadena iniciadora, como ha sido observado por experiencias de sedimentación, incluso después de desnaturación alcalina ^(149,167,170).

Han sido realizado estudios sobre enlace y comportamiento funcional de varios análogos de nucleótidos para determinar la especificidades de la unión de la DNA Polimerasa al extremo de la cadena iniciadora ^(8,159). La mayor parte de los análogos utilizados carecían de grupos $(3')\text{-OH}$. Tales análogos, si se adicionan a una cadena iniciadora, impiden el crecimiento posterior de la cadena al dejarle carente del grupo extremo $(3')\text{-OH}$.

Un ejemplo de los análogos utilizados es la dideoxitimidina trifosfato. Este análogo puede enlazarse a la enzima y, en presencia de una cadena molde y una cadena iniciadora, se adiciona uno solo de estos nucleótidos por cadena iniciadora. La cadena terminada con ese dideoxinucleótido es inerte a una elongación posterior y es relativamente inerte a la acción exonucleolítica; el ataque por pirofosfato inorgánico, queda también inhibido, pero la cadena puede ser degradada desde el extremo 5'

(dirección $5' \rightarrow 3'$). Estos resultados han sido interpretados como que la cadena creciente no puede enlazar a la enzima en el sitio para el extremo iniciador debido a que carece del grupo $(3')\text{-OH}$, por lo que no es sustrato efectivo para ninguna de las funciones de la enzima que requieran la presencia del extremo iniciador en el centro activo⁽¹⁹⁵⁾. Comportamiento análogo ha sido obtenido cuando se elimina el grupo $(3')\text{-OH}$ por esterificación con fosfatos. Sin embargo, pueden ser toleradas muchas otras alteraciones con tal de que conserven el grupo extremo $(3')\text{-OH}$ ⁽¹⁵⁹⁾. Por ejemplo, los $(3')\text{-OH}$ desoxinucleótidos monofosfato se enlazan a la enzima en el sitio para el extremo iniciador, como se ha confirmado por el hecho de que estos monofosfatos inhiban la hidrólisis de polinucleótidos desde el extremo $3'$ de la cadena. Se han dado otras pruebas, además, ⁽¹⁵⁹⁾ que dejan claro la existencia de un solo sitio en el centro activo de la enzima para el extremo de cadena iniciadora que sirve tanto para la polimerización y sus reacciones inversas como para la hidrólisis en dirección $3' \rightarrow 5'$ ⁽⁸⁾.

Sin embargo, la Polimerasa no cataliza la adición de nucleótidos para la extensión de la cadena si el nucleótido terminal de la cadena iniciadora no está apareado con una cadena molde mas larga que puede dirigir la incorporación de nucleótidos⁽¹⁶⁷⁾.

Por tanto, y resumiendo, aunque la enzima pueda asociarse a distintas estructuras de DNA, para que la asociación sea activa en la polimerización es necesario que en el centro activo de la enzima estén presentes dos cadenas polinucleotídicas: la cadena iniciadora, cuyo extremo $(3')\text{-OH}$ está enlazado al centro activo de la enzima y cuyo nucleótido terminal está enlazado por puentes de hidrógeno a la otra cadena presente en el centro activo, la cadena molde. Cuando el nucleótido terminal de la cadena

iniciadora no está apareado por las bases con la cadena molde puede enlazarse a la enzima y ser eliminado por su acción hidrolítica en dirección 3' a 5' hasta encontrar el nucleotido que se presenta unido a la cadena molde, como ha sido postulado en el modelo dado por Englund⁽²⁷⁾. Sin embargo, en el momento de iniciación de la polimerización, la enzima requiere que el nucleotido terminal se presente unido a la cadena molde⁽⁶⁹⁾, ya que la extensión de la cadena comienza solo después de que han sido eliminados los nucleotidos desapareados. Este apareamiento se conserva mientras se mantiene la polimerización⁽¹⁶⁷⁾.

I.1.3.6. Unión a los desoxirribonucleotidos.

La mayor parte de los estudios de asociación de los desoxirribonucleosidos trifosfato a la enzima han sido realizados a partir de datos obtenidos mediante diálisis en equilibrio en cámaras de microdiálisis que permiten un rápido equilibrio entre trifosfatos no asociados⁽¹⁷⁴⁾. Se ha podido determinar de esta forma que la enzima posee un solo lugar de enlace para los trifosfatos, conociéndose las constantes de disociación del complejo enzima-trifosfato para cada uno de ellos. Aunque los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfato difieren en su afinidad por la enzima, las diferencias son de difícil interpretación⁽¹⁷⁰⁾. Además, estos datos de afinidad no presentan gran interés debido a que tanto la cadena de DNA molde como la iniciadora no estén presentes en la realización de estos estudios, y, como es obvio, su influencia sobre el enlace del trifosfato a la enzima ha de ser grande.

Otra cuestión importante sobre la asociación enzima-trifosfatos es si existe en la enzima un sitio por el cual tienen que competir todos los trifosfatos.

Los estudios con dialisis en equilibrio de combinaciones de dos trifosfatos han establecido que hay un solo sitio de unión en la enzima común por el que compiten los trifosfatos.

Los estudios realizados sobre la especificidad del enlace en este sitio enfatizan la importancia de la agrupación trifosfato y la sola secundaria importancia de los componentes azúcar o base⁽¹⁷⁴⁾. Parece que el requerimiento estructural principal para detectar el enlace a ese centro es la posesión del grupo trifosfato, confirmado por las experiencias de asociación con diferentes ligandos. Ha sido observado⁽¹⁷⁴⁾ que todos los trifosfatos en posición 5', cualquiera que sea el azúcar y cualquiera que sea la base, compiten por el sitio de enlace a la enzima. Igualmente, todos los trifosfatos en posición 3' compiten por ese sitio pero con menor afinidad que las (5')-trifosfatos. Sin embargo, los desoxirribonucleosidos a los que faltaban los tres grupos fosfato no presentaban competencia por el punto de enlace a la enzima. Además, los desoxirribonucleosidos monofosfato, tanto en posición 3' como en 5', y los desoxirribonucleosidos difosfato, así como los pirofosfatos, enlazan a la Polimerasa, aunque por un segundo sitio, distinto al sitio de unión a los trifosfatos⁽¹⁷⁰⁾.

La interpretación de la importancia secundaria en el enlace a la enzima del azúcar o de la base es limitada, ya que en esas experiencias no están presentes la cadena molde ni la iniciadora cuya influencia debe ser decisiva sobre el enlace. Los efectos del DNA sobre la unión trifosfato-enzima son difíciles de estudiar experimentalmente ya que en su presencia se produce rápidamente la polimerización. Lo único determinado hasta ahora es que en ausencia de DNA el centro activo de la enzima puede acomodar a las cuatro bases naturales: adenina, guanina, citosina y timina y a tres azúcares dis-

...ntos: ribosa, desoxirribosa y didesoxirribosa. Por otro lado, en presencia del molde, la carencia de un determinado desoxinucleotido trifosfato interrumpe la polimerización, puesto que cuando no estén presentes todos los desoxirribonucleotidos necesarios, la polimerización es muy limitada.

En la mayor parte de los modelos de polimerización presentados^(8,69,164,197) se postula que la base de la especificidad de la unión a la enzima de un desoxirribonucleosido trifosfato no está en el reconocimiento por la enzima de un trifosfato enlazable sino mas bien en la demanda de una de las cuatro bases para formar un par correcto con la cadena molde. Todos los pares de bases Watson-Crick contienen regiones de dimensiones y geometría idénticas y son simétricos. Cuando la base correcta para la formación del par esté dentro del centro activo, la enzima puede responder, según se postula, posiblemente por un cambio de conformación, de manera que se proceda a la siguiente etapa catalítica. Si se hubiese enlazado un trifosfato incorrecto, no se habría formado el par de bases correcto, no hubiese habido el cambio conformacional y el trifosfato sería rechazado⁽⁸⁾.

I.1.3.7. Actividades hidrolíticas de la DNA Polimerasa.

Klett y Cerami⁽¹⁴⁷⁾ descubrieron que la actividad exonucleolítica de la DNA Polimerasa I de E. coli implica el ataque a las cadenas de DNA tanto en el extremo 3' como en el extremo 5'. El grupo de Kornberg tiene observaciones análogas^(148,167,198). Estas acciones hidrolíticas no pueden ser adscritas a la presencia de endonucleasas, exonucleasas o fosfatasas presentes como impurezas en la preparación de DNA Polimerasa, sino que constituyen parte de la actividad enzimática de la proteína. Por otra parte, constituye una característica espe-

cial de la DNA Polimerasa I de E. coli ya que las otras Polimerasas de E. coli o las aisladas de M. luteus, B. subtilis o de E. coli infectadas con fagos T4 o T2 no poseen la acción exonucleolítica que hidroliza en 5' si no solamente la que hidroliza en el extremo 3'.

Sin embargo, estas dos actividades exonucleolíticas de la Polimerasa I han sido separadas, presentándose cada una de ellas en fragmentos distintos de la enzima, cuando se realiza la proteólisis de la Polimerasa^(148,165,166). La actividad hidrolítica sobre el extremo 3' sigue acompañando a la actividad polimerásica, presentándose en el fragmento de mayor tamaño. El fragmento mas pequeño, en cambio, posee sólo actividad hidrolítica sobre el extremo 5' de las cadenas de DNA^(13, 149).

La actividad hidrolítica del fragmento pequeño se parece a la de la enzima intacta que actúa sobre los extremos 5' de cadenas polinucleolídicas puesto que degrada DNA a mono- y oligonucleotidos y es capaz de eliminar regiones erróneas del DNA tales como los dímeros de timina^(13,149), difiere, en cambio, de la enzima intacta en que los desoxirribonucleotidos necesarios para la polimerización no estimulan su acción exonucleolítica ni incrementan la cantidad de oligonucleotidos producidos. Sin embargo, en una mezcla de los dos fragmentos y un DNA poseyendo roturas simples, en presencia de los desoxirribonucleosido~~s~~ trifosfatos, ha sido observada la misma influencia de la polimerización sobre la actividad exonucleolítica actuante sobre el extremo 5' que en la enzima intacta; parece, entonces, que los dos fragmentos pueden enlazar adyacentemente en una rotura simple, unidos a cada uno de los extremos correspondientes, para dar la polimerización coordinada con una función exonucleolítica desde el extremo 5', que caracteriza a la enzima intacta⁽¹⁶⁶⁾.

Las dos actividades exonucleolíticas de la Polimerasa I presentan diferencias en cuanto a requerimientos estructurales del DNA sobre el que actúan. La hidrólisis en dirección 5' a 3' requiere un DNA bihelicoidal, mientras que la hidrólisis en dirección 3' a 5' suele realizarse sobre cadenas polinucleotídicas sencillas y cortas. Las cadenas desprovistas de estructura secundaria apreciable pueden ser relativamente resistentes a la hidrólisis desde el extremo 5' pero no a la hidrólisis desde el extremo 3', incluso, la hidrólisis desde el extremo 3' es más rápida actuando sobre cadena sencilla que sobre cadena doble^(67,149,167).

Otra diferencia entre ambas actividades hidrolíticas es su forma de actuación cuando están presentes los desoxinucleosidos trifosfatos. La actividad exonucleolítica que actúa sobre el extremo 3' de la cadena apareada con el molde queda inhibida completamente por la presencia de los trifosfatos. Pero no todos los trifosfatos que pueden enlazarse competitivamente en el centro activo de la enzima inhiben la acción nucleásica sino sólo aquellos complementarios de la cadena molde, necesarios para la polimerización. Igualmente, los análogos de los trifosfatos que enlazan competitivamente en el centro activo de la enzima y que inhiben la polimerización no inhiben la acción nucleásica 3' → 5'. Es decir, es necesario que el trifosfato establezca y mantenga un complejo efectivo de polimerización con la cadena molde y el extremo de la cadena iniciadora, para inhibir esta acción nucleásica⁽¹⁶⁷⁾. Un tercer requerimiento para la protección del extremo 3' a la acción nucleásica es que el nucleótido terminal presente su base apareada con la del molde. Si el extremo no está apareado, se produce la hidrólisis hasta que el nuevo nucleótido extremo presente apareamiento con el molde, momento en el cual se inicia la polimerización⁽¹⁶⁷⁾. Esto

indica que la enzima no cataliza la polimerización sobre un extremo 3' que no esté apareado a la cadena molde, y que necesita que se elimine previamente a los nucleótidos del extremo 3' no apareados por la acción exonucleásica.

En cambio, la actividad exonucleolítica que actúa sobre el extremo 5' aparece muy incrementada por la presencia de los desoxinucleosidos trifosfato⁽¹⁹⁹⁾. Análogamente al caso de la otra actividad exonucleolítica, se requieren los trifosfatos necesarios para la polimerización⁽¹⁷⁴⁾. Cuando se utiliza como extremo iniciador las roturas simples producidas en el DNA por tratamiento con DNasa pancreática, las cinéticas de degradación coinciden con las de síntesis; en cambio, en ausencia de la síntesis, la velocidad inicial de hidrólisis es unas veinte veces mas baja⁽¹⁴⁹⁾.

La actividad exonucleolítica de la enzima que actúa sobre el extremo 5' produce una característica mezcla de mono y oligonucleótidos en la degradación de sustratos de doble cadena, con la característica de que la distribución de productos no viene afectada por la extensión de la hidrólisis del sustrato^(149,166). Sin embargo, esta actividad hidrolítica no puede actuar como una endonucleasa puesto que existe un límite para el tamaño del oligonucleotido que puede liberar⁽¹⁶⁶⁾; así, puede eliminar dímeros de timina en oligonucleótidos de 4 a 8 residuos de longitud⁽¹³⁾, pero la probabilidad de eliminación de oligonucleótidos mayores es muy baja. No se conoce el mecanismo por el que se pueden liberar esos oligonucleótidos de diferentes tamaños. La utilización en estos estudios del fragmento pequeño procedente de la proteólisis de la Polimerasa, ha eliminado la validez de la interpretación dada para la enzima intacta de orientación del extremo del nucleotido terminal en el centro de

polimerización para la liberación preferencial del dinucleótido terminal^(37,174). Parece mas aceptable la hipótesis de que los movimientos de la cadena con extremo 5' a través del centro activo permiten romper enlaces fosfodister subterminales con frecuencia decreciente, de manera que la distribución de productos se explicaría simplemente si se fija una probabilidad de rotura para cada enlace y se supone que la frecuencia con que se produce un oligómero de n monómeros es n veces la probabilidad de que no se rompan los enlaces precedentes $(1 - p)^{n-1}$, de tal manera que cuando n se incrementa la fracción disminuye rápidamente⁽¹⁴⁹⁾.

Como la distribución de frecuencias de los oligómeros se mantiene durante la hidrólisis asociada a la síntesis, es posible creer que esta actividad hidrolítica es una parte integral de la función enzimática y puede ser asociada "in vivo" con la función de reparación de regiones alteradas de DNA, resistentes a la hidrólisis, las cuales son eliminadas como oligonucleótidos y reemplazadas⁽²⁰⁰⁾.

La acción hidrolítica que actúa sobre el extremo 3' produce mononucleótidos con un grupo fosfato en 5'. Esta acción hidrolítica de la enzima requiere que el extremo 3' sobre el que actúe posea un grupo hidroxilo, ya que los sustratos que poseen un grupo fosfato en posición 3' son resistentes a la hidrólisis desde ese extremo⁽¹⁹⁸⁾. Este requerimiento análogo al de la actividad polimerizante, el no haber sido posible separar esta actividad de la polimerizante y la existencia de un solo sitio de enlace en la enzima para el DNA, han sugerido que ambas actividades ocurren en el mismo centro activo. Beyersman y colaboradores⁽¹⁶¹⁾ han dado pruebas cinéticas para ese sitio común. Esto llevaría a la idea de dos formas para el complejo DNA-enzima: una, con

el extremo de la cadena iniciadora apareada a otra cadena (molde) que podría conducir bien a la incorporación del trifosfato bien al ataque por pirofosfato, y otra forma en la que el extremo 3' no se presenta apareado y que sería solo evolucionable hacia hidrólisis⁽¹⁶⁷⁾.

Para justificar la actuación simultánea de polimerización e hidrólisis en los extremos correspondientes de una rotura simple en una molécula de DNA se ha supuesto que el sitio para la actividad exonucleásica actuando sobre el extremo 5' esté orientado relativo al de la polimerización para permitir a una sola enzima sintetizar e hidrolizar simultáneamente⁽²⁰¹⁾. Otra posibilidad que ha sido apuntada es que la síntesis cause el desplazamiento del extremo 5' de la rotura simple para que entonces fuese degradado por la actividad hidrolítica de otra molécula de Polimerasa; esta posibilidad sería menos probable ya que esta actividad exonucleolítica presente requiriendo de cadena doble para el sustrato⁽¹⁴⁹⁾. Los estudios realizados en este sentido utilizando los fragmentos obtenidos en la proteólisis de la Polimerasa han añadido nueva luz al separar ambas actividades, hidrolítica y polimerizante, y al observar que mezclas de los dos fragmentos pueden actuar simultáneamente sobre una rotura simple, en condiciones de saturación de la mezcla frente a la cantidad de sustrato. Esto indica la existencia de sitios distintos para cada actividad existentes en trozos distintos de la cadena polipeptídica, unidos por enlace susceptible a proteólisis, que puede actuar simultáneamente en los extremos correspondientes de una rotura de una cadena polinucleotídica.

El estudio de la acción de los fragmentos separados de la Polimerasa sugiere que la actividad exonucleolítica que actúa sobre el extremo 5' no es necesaria para la polimerización, incluso cuando se utiliza como molde un DNA con roturas simples en sus cadenas. El fragmento

to largo de la proteólisis aunque no tiene actividad exonucleásica sobre un extremo 5', es completamente capaz para catalizar la síntesis con un molde de doble cadena con roturas simples. Se ha supuesto que, probablemente, el fragmento largo desplaza la cadena de extremo 5' al otro lado del extremo ((3')-OH creciente por la síntesis⁽⁶⁷⁾. Se han dado modelos^(13,149) donde se supone también que la enzima intacta causa la separación de la cadena de extremo 5' al desplazar la rotura simple por efecto de la síntesis. Estos modelos han sido propuestos para justificar bien la degradación de la cadena con producción de oligonucleotidos⁽¹⁴⁹⁾, -aunque este modelo no aclararía la razón para el límite aparente de tamaño de los oligonucleotidos producidos⁽¹⁶⁶⁾ -, bien la ramificación observada de la cadena de DNA durante la síntesis. Este último modelo supone que la cadena con extremo 5' se desplaza por causa de la síntesis producida en el otro extremo de la rotura simple de una cadena de DNA, hasta un punto en que, por razones no determinadas en el modelo, compite con éxito por la función molde atrayendo la cadena creciente para continuar como molde reemplazando a la otra cadena; esto daría lugar a una Y covalente en la cadena creciente^(8,177).

Se han presentado modificaciones al modelo dado por Kornberg⁽⁸⁾ para explicar la hidrólisis desde el extremo 5' simultánea con la polimerización⁽¹³⁾; el objeto de esas modificaciones es proponer la posibilidad de hidrolizar el DNA en regiones bihelicoidales donde se producen una serie de residuos no apareados, excindiendo oligonucleotidos conteniendo esos residuos.

En esas modificaciones se supone un sitio para la actividad hidrolítica distinto que el de polimerización, y que ese sitio puede acomodar una estructura bihelicoidal, una de cuyas cadenas presenta un corto frag-

de

mento extremo sin posibilidades de apareamiento; la actividad hidrolítica destruye el enlace internucleotídico justo en el punto donde aparece la primera base desapareada, eliminando el fragmento de nucleótidos desapareados. Aunque experimentalmente se sabe que hay un límite para el tamaño de la cadena que se puede llegar a eliminar por este procedimiento, resulta difícil para los modelos propuestos dar cuenta de ello, suponiéndose a ese límite por encima de los 8 nucleótidos. En los modelos propuestos para la eliminación de dímeros de timina⁽³⁸⁾, la Polimerasa requiere la acción previa de una endonucleasa que reconoce la zona alterada, bien por la presencia del dímero, bien por la distorsión que éste crea en la cadena, y produce una rotura en la cadena cerca del dímero^(146,150); la Polimerasa requiere que la excisión de la región alterada se realice en el lado 5' del dímero de timina, ya que la reparación de la zona alterada requiere un extremo [(3')-OH libre en el corte (introducido bien por la endonucleasa o por subsiguiente actuación de una fosfatasa). Si el corte está muy cerca del dímero podrá producirse desnaturación local; la Polimerasa restaura la estructura doble hélice adicionando nucleótidos covalentemente hasta que alcanza el lado opuesto de la zona alterada, en el cual la actividad exonucleolítica de la enzima corta la región alterada eliminándola como un oligonucleotido. Según los modelos propuestos, la Polimerasa continúa trasladando la rotura simple que queda, después de la eliminación y reparación de la zona alterada, desplazándola a lo largo de la hélice en dirección 5' a 3' hasta que interviene una ligasa cerrando el corte, momento en que queda completa la reparación^(66,202).

El acoplamiento de las actividades polimerásica y de eliminación de zonas alteradas en una sola enzima puede tener ventajas significativas en las reparaciones "in vivo" de lesiones de DNA; así, por ejemplo la no re

paración a tiempo de una zona excindida llevaría a crearse en el DNA un boquete con cadena sencilla que podría ser atacado en el extremo 3' por exonucleasas, produciendo degradación a fondo del DNA. En cambio, su actuación a tiempo produce solo un corte nítido con extremos con grupos oxihidrilo y fosfato en posiciones 3' y 5', respectivamente, del cual puede ser desplazada la enzima por una DNA ligasa. Posiblemente, la extensa degradación observada en el DNA, después de irradiación ultravioleta, de los mutantes de E. coli faltos de DNA Polimerasa I, es el resultado de la producción de boquetes de cadena sencilla durante la excisión de dímeros de timina por sistemas secundarios de reparación^(154,156).

El estudio presentado por Brutlag y Kornberg⁽¹⁶⁷⁾ sobre la especificidad de la actividad exonucleolítica que actúa sobre el extremo 3', mantiene especulaciones anteriores^(8,27,69) sobre que esta actividad pueda ser designada para eliminar nucleotidos desapareados que han sido incorrectamente incorporados al extremo 3' de un DNA bihelicoidal, y actuando, por tanto, como un "corrector de pruebas". Esto hace que la fidelidad en la copia del molde sea muchísimo mayor debido a la existencia de dos sistemas de selección del apareamiento de bases: por un lado la selección de un nucleotido concreto para la polimerización y por otro la determinación de si el extremo creciente está correctamente apareado antes de adicionar un nuevo nucleotido⁽¹⁶⁷⁾. Es interesante constatar que hasta ahora todas las Polimerasas estudiadas poseen esta actividad hidrolítica asociada con la polimerizante, lo cual puede señalar la importancia de esa actividad para el desarrollo del proceso de polimerización dirigido por un molde⁽²⁷⁾. Como consecuencia de la importancia de la actividad "correctora de pruebas" de la Polimerasa para la exactitud de la replicación, se ha llegado a pensar que una alteración o defecto de esta actividad podría causar

efectos mutagénicos (167,202-206).

La especificidad de las acciones hidrolíticas de la DNA Polimerasa I y de otras exonucleasas de E. coli demuestra que son capaces de una acción hidrolítica coordinada sobre gran variedad de estructuras. Así, por ejemplo, la actividad exonucleolítica de la Polimerasa I que hidroliza cadenas sencillas es equivalente a la acción combinada de las Exonucleasas I y III. La acción redundante de las enzimas y su naturaleza multifuncional indica que cada una de ellas puede estar implicada en mas de un proceso. Esta naturaleza redundante puede asegurar la integridad del metabolismo del DNA y su carácter multifuncional la correcta coordinación de estos acontecimientos moleculares vitales (167).

I.1.3.8. Otras Actividades de la DNA Polimerasa.

Además de las actividades polimerizantes e hidrolíticas, la DNA Polimerasa I de E. coli puede actuar catalizando la pirofosforolisis de un DNA o el cambio de pirofosfato de un desoxinucleosido trifosfato. La pirofosforolisis se ha considerado como inversa de la polimerización, incluyendo el movimiento de cadena concertado. El cambio de pirofosfato parece ser el resultado de una secuencia de etapas de polimerización y pirofosforolisis repetidas sucesivamente; sin embargo, como la velocidad de cambio de pirofosfato es considerablemente mayor que la de pirofosforolisis, ha sido sugerido que el ataque por PP_i ocurre probablemente en un estado de transición correspondiente a las etapas de polimerización (8).

Para que se produzca el cambio de pirofosfato se requiere la presencia de las cadenas molde e iniciadoras unidas por puentes de hidrógeno y el desoxinucleosido tri-

fosfato adecuado para aparearse con la cadena molde al situarse en el sitio para el trifosfato, requerimientos análogos a los de polimerización. En la reacción de polimerización, el trifosfato enlazado es atacado por el grupo OH situado en el extremo 3' de la cadena iniciadora, desplazándose el PP_i e incorporándose el nucleotido a la cadena creciente. La simultaneidad de la polimerización con el cambio de pirofosfato indica que el nucleotido, después de enlazado a la enzima, se activa de tal manera que facilita el cambio con una molécula de pirofosfato inorgánico. Ya que los requerimientos para el cambio son los mismos que para la polimerización, se ha postulado⁽¹⁷⁰⁾ que el nucleotido activado está covalentemente unido a la cadena iniciadora o próximo a un estado covalente; este nucleotido activado puede entonces ser eliminado por ataque con pirofosfato, adicionarse otro nuevo nucleotido y así continuar el ciclo dando lugar al cambio de pirofosfato en los nucleotidos.

En la pirofosforólisis del DNA hay también ataque por pirofosfato inorgánico sobre el nucleotido terminal del extremo 3' de la cadena iniciadora. Se requiere, al igual que para la polimerización, que el nucleotido del extremo 3' de la cadena posea un grupo OH libre y su base esté apareada con alguna de la cadena molde⁽¹⁶⁷⁾. Después de destruido el enlace internucleotídico, la Polimerasa enlaza en el nuevo extremo 3' liberado, continuando así la degradación de la cadena.

I.1.3.9. Modelos para la polimerización.

Los modelos que han sido descritos para justificar las características de la polimerización de DNA dependen críticamente de la estructura postulada para el DNA que actúa de molde.

El modelo mas simple lo constituye la restauración de un DNA bihelicoidal en una zona de cadena sencilla producida, por ejemplo, por hidrólisis con Exonucleasa III⁽¹⁸²⁾. El proceso puede ser el siguiente: el trifosfato se enlaza adyacente al grupo OH del nucleotido terminal del extremo 3' de la cadena iniciadora y se orienta de tal forma que puede presentar contacto directo y formar un par de bases con la cadena molde. Cuando se ha formado el par de bases correcto, se produce un ataque nucleofilico del grupo (3')-OH del extremo creciente sobre el fosfato α del trifosfato. En la mayor parte de los modelos postulados ha sido supuesto que el movimiento de la cadena relativo a la enzima es simultáneo con la formación del enlace diester. Cuando el extremo iniciador pierde su grupo (3')-OH por transformación dentro del enlace internucleotídico, se pierde la unión al sitio para el extremo iniciador. A través de un movimiento de la cadena entera se reemplaza el extremo iniciador por el nucleotido adicionado, que también posee un grupo terminal (3')-OH, permaneciendo en el sitio dispuesto para el ataque de otro trifosfato y adición de un nuevo nucleotido. Este modelo o análogo puede ser aplicado a todas las Polimerasas estudiadas⁽¹⁷⁸⁾.

La polimerización sobre un DNA de cadena sencilla depende de la posibilidad de formación de zonas bihelicoidales en el extremo 3', de forma que esta sirva de extremo iniciador para la copia del otro extremo de cadena⁽⁶⁹⁾. En el caso de que el extremo 3' no este apareado, la acción hidrolítica de la enzima que actúa sobre el extremo 3' elimina todos los nucleotidos no apareados. Cuando la enzima alcanza la región apareada, cambia su dirección de movimiento y comienza la incorporación de nucleotidos hasta que la cadena creciente iguala a la cadena molde⁽²⁷⁾.

La copia de un DNA circular de cadena sencilla requiere un oligonucleotido para actuar de extremo iniciador, apareándose a un fragmento del anillo, siendo eliminado posteriormente por la acción exonucleolítica de la Polimerasa que actúa sobre el extremo 5', (147,172). El oligonucleotido apareado a la cadena circular crece por acción de la Polimerasa copiando a la cadena circular hasta que encuentra al otro extremo del oligonucleotido inicial, momento en que actúa la actividad hidrolítica de la enzima sobre ese extremo 5' y se producen las dos acciones simultáneamente: polimerización desde el extremo 3' y eliminación de la cadena sintetizada desde el extremo 5'; el modelo presentado^(172,208) no prevee la detención de estas actividades simultáneas, a no ser que se añada una ligasa que enlace los extremos 3' y 5' próximos, dando lugar a una doble cadena circular completa, estructura que resulta inerte frente a la DNA Polimerasa^(8,207).

Como hemos dicho al comentar la unión DNA-enzima, un DNA doble helicoidal intacto, tanto lineal como circular, no puede ser utilizado como molde por la Polimerasa I; la enzima puede enlazarse al extremo 3' de una de las cadenas del DNA lineal, pero, sin embargo, no puede catalizar la adición de nuevos nucleotidos al carecer de una cadena molde que dirija la incorporación, ya que la cadena complementaria no se extiende mas allá que el extremo iniciador. Este resultado ha sido confirmado experimentalmente con DNA de fago T7 cuidadosamente aislado para evitar toda rotura interna⁽²⁰⁹⁾. Por tanto, el modelo original Watson-Crick, para la replicación de un DNA doble helicoidal lineal desde uno de sus extremos, no puede ser aplicado a la acción de la Polimerasa "in vitro", aún para una de las cadenas. Sin embargo, cuando esas estructuras bihelicoidales presentan una excisión en una de las cadenas, lo que venimos denominando una rotura simple, dejando libre un grupo OH en posición 3', es posible la po

limerización⁽²¹⁰⁾. La mayor parte de los modelos de polimerización propuestos para la Polimerasa I suponen que el centro activo de la enzima enlaza al DNA en una rotura simple, basándose en datos experimentales que llevan a concluir que la introducción de escisiones dentro de las cadenas del molde por tratamiento con DNasa pancreática incrementa la polimerización linealmente en proporción al número de cortes y que todas las moléculas de DNA doble helicoidales son igualmente activas cuando se expresa su actividad como molde como el número de residuos incorporados por cada escisión producida^(149,171).

Como hemos comentado anteriormente, el crecimiento de la cadena en una de las escisiones por extensión del extremo 3' debe llevar consigo desplazamiento o eliminación del otro extremo producido por la escisión. Como el crecimiento de la cadena está acompañado inicialmente por una acción hidrolítica, de forma que la extensión de la síntesis suele igualar a la de hidrólisis⁽²¹¹⁾, se ha postulado en estos modelos de polimerización que la acción exonucleolítica de la Polimerasa que actúa sobre un extremo 5' hidroliza la cadena al otro lado del corte, por lo que la actuación simultánea de las actividades polimerizante e hidrolítica darán lugar a la traslación de la rotura simple a lo largo de la cadena. En algunos modelos se postula que en las últimas etapas se interrumpe la hidrólisis de la cadena con extremo 5', produciéndose exclusivamente la síntesis. No está claro este último mecanismo, pero puede dar lugar a un desplazamiento de la cadena⁽¹⁴⁹⁾.

Al igual que en el caso del DNA circular, el desplazamiento de la rotura simple, debido a la acción combinada polimerización-hidrólisis, puede ser interrumpido por la actuación de una DNA ligasa uniendo los extremos 3' y 5' del corte. Pero si no está presente esta última enzima, ningún modelo tiene prevista la interrupción

de la traslación de la escisión mientras existe cadena molde que copiar, lo cual lleva consigo que el corte se desplazaría hasta que se enfrente a otra rotura simple en la cadena antiparalela o hasta el extremo de la cadena en el caso de que no existiera ninguna escisión en la cadena molde. Sin embargo, los datos estimados de la escisión de dímeros de timina "in vivo" indican que se reemplazan de 20 a 50 nucleótidos por cada dímero de timina eliminado^(212,213,240). Según el modelo que hemos comentado para la eliminación de zonas alteradas en las cadenas de DNA (pag. 38), este número depende de la distancia que la Polimerasa traslada el corte antes de que sea desplazada por la ligasa.

En las especulaciones que se han llevado a cabo sobre el papel de la DNA Polimerasa I de E. coli en la replicación cromosómica, se han propuesto modelos que intentan justificar la participación de esta enzima en la replicación. Los cromosomas bacterianos son estructuras circulares bihelicoidales. Los modelos se basan en que cuando están intactos, son inertes a la replicación; la introducción de roturas simples posiblemente en un sitio específico, pondría en marcha la replicación. Los modelos suponen que la Polimerasa enlaza en la escisión producida en una de las cadenas y se produce la replicación por extensión covalente del extremo 3'. El extremo 5' de la escisión puede ser degradado en alguna extensión por la acción nucleásica que actúa sobre el extremo 5' o bien desplazado, quedando dispuesto para un ataque posterior. La fijación en algún sitio de la membrana^(139,214) puede facilitar el desplazamiento y preservación de la cadena de extremo 5'. La replicación se produce entonces durante alguna distancia, girando a continuación hacia la cadena que había sido desplazada, que actúa entonces de molde, formándose de esta forma una horca (Y). Esta Y así formada se puede

... eliminar por acción de una endonucleasa. La repetición de esta secuencia llevaría a la producción de pequeñas piezas de DNA cerca de la Y de la replicación. Tales piezas han sido aisladas por Okazaki et al.⁽⁵⁷⁾ en la región de la replicación o cerca de ella. Se postula que los trozos pequeños de DNA podrían ser empalmados por una ligasa. Si este esquema, fuese esencialmente correcto explicaría como una enzima, replicando exclusivamente en dirección 5' a 3', podría copiar, incluso casi simultáneamente las dos cadenas de polaridad opuesta. Sin embargo, este modelo está en contradicción con datos experimentales^(215,216) que sugieren una replicación secuencial y simultánea de las dos cadenas y con los modelos de replicación bidireccional propuestos⁽²¹⁷⁻²³¹⁾, aunque en aspectos aislados presente acuerdo con la experimentación⁽²³²⁻²³⁹⁾.

Aunque, como hemos comentado ya anteriormente, no hay ideas claras sobre cuales pueden ser las enzimas implicadas en la replicación cromosómica, no parece que las propiedades y características de la DNA Polimerasa I de E.coli sea la enzima idónea para los modelos de replicación existentes. En cambio se le ha dado un papel preponderante en modelos de reparación de zonas alteradas de DNA^(13, 34,240,241). Los modelos de reparación que han sido propuestos son esencialmente análogos al ya comentado para la liberación de dímeros de timina (pag. 38)⁽²⁴⁰⁻²⁴⁴⁾.

I.1.3.10. Iniciación de cadenas.

El hecho de que la DNA Polimerasa I de E. coli se diferenciase de las Polimerasas inducidas por fagos en su posibilidad de utilizar segmentos lineales de DNA doble helicoidal, hizo que se diese por supuesto que la

enzima de *E. coli* podría iniciar cadenas de DNA "de no vo" a partir del extremo 3' ⁽²³⁶⁾. Sin embargo, se ha comprobado que esta suposición inicial fué errónea y que ninguna de las Polimerasas conocidas puede utilizar un DNA doble hélice intacto como molde, siendo incapaces de iniciar la síntesis desde los extremos, sin la presencia de un extremo iniciador.

Las experiencias realizadas con DNA de fago de cadena circular sencilla son concluyentes en este sentido, y así, no se puede iniciar su replicación sin el requerimiento de un oligonucleotido iniciador, que, cuando esté presente en cantidades limitantes controla la polimerización haciéndola proporcional al número de oligonucleotidos presentes aún después de tiempos de incubación largos ^(8,27) permitiendo que todos los anillos pasasen a estructuras dobles solo cuando el oligomero estaba en cantidades suficientes.

Además, si pudiese ocurrir la iniciación de las cadenas, el primer nucleotido incorporado conservaría los grupos fosfatos β y γ del desoxinucleotido inicial, ya que el grupo trifosfato del primer nucleotido no intervendría para nada en la polimerización. Si la iniciación fuese posible, se podría forzar la iniciación de la síntesis con un desoxinucleosido monofosfato, como ocurre con la RNA Polimerasa. Sin embargo, los datos obtenidos utilizando β - γ ³²-P-trifosfato con la Polimerasa I de *E. coli* no hacen pensar en iniciación de nuevas cadenas, aunque esto podría ser achacado al alto nivel de actividad exonucleásica que tiene. Experimentos análogos realizados con la Polimerasa de *M. luteus*, que contiene un bajísimo nivel de actividad exonucleásica sobre extremos 5', indican que el DNA sintetizado no contenía extremos trisfosfato. Por otro lado, los estudios de iniciación de polimerización con monofosfatos demostraron

que la Polimerasa no puede usar monofosfatos para iniciar la síntesis sino que es necesaria la existencia previa de oligonucleotidos. La longitud mínima de cadena necesaria para que se inicie la síntesis no ha sido determinada pero es mayor que un mononucleotido.

De todo lo que venimos comentando podemos entresacar las razones que nos han inducido a utilizar esta enzima, la DNA Polimerasa I de E. coli, para nuestro estudio estructural de la alteración producida por las radiaziones ionizantes sobre el DNA. El perfecto conocimiento que existe actualmente sobre los mecanismos de las diferentes actividades que presenta esta enzima así como de sus requerimientos para actuación, hacen que sea un instrumento apto para ese estudio.

Recientemente se han encontrado varias aplicaciones a la utilización de esta enzima como instrumento para el estudio de DNA, como, por ejemplo en el análisis secuencial de DNA⁽²⁴⁵⁻²⁴⁹⁾.

I.2. DEGRADACION RADIOLITICA DEL DNA.

Consideramos interesante para nuestro estudio revisar algunos aspectos conocidos sobre el tipo de alteración que experimenta el DNA como consecuencia de su interacción con las radiaciones ionizantes. Mas que en el mecanismo de degradación por el cual se produce la pérdida de peso molecular, -perfectamente conocido y para el cual se han propuesto modelos⁽²⁵⁰⁾-, creemos conveniente centrarnos en la estructura de la alteración local producida en la macromolécula por efecto de su irradiación en solución acuosa.

En este sentido, comentaremos aquí solamente algunos puntos que nos permitan establecer la naturaleza del agente activo de las radiaciones cuando se irradian soluciones acuosas, como éste actúa sobre los componentes del biopolímero, que tipo de alteración produce sobre ellos y de que manera ésta puede repercutir sobre la macromolécula.

I.2.1. RADIOLISIS DE SOLUCIONES ACUOSAS.

En la interacción de las radiaciones electromagnéticas ionizantes con la materia, la transferencia de energía se produce siempre, independientemente de la naturaleza de aquellas, por un mecanismo de interacción de la materia con partículas cargadas dotadas de alta energía cinética, originadas por efecto del fotón.

Según la expresión de Bethe-Bloch⁽²⁵¹⁾, la energía transferida en la interacción depende, en primera aproximación, de la densidad de electrones por unidad de volumen del material de que se trate. El fenómeno presenta, por tanto, un efecto másico, quedando desprovisto de especificidad a nivel molecular.

Para el caso de soluciones acuosas de DNA, donde las diferentes especies atómicas que los constituyen presentan muy poca diferencia en número atómico, tampoco se puede hablar de especificidad atómica, a no ser que la transferencia de energía tuviese lugar con los átomos de fósforo, en los que la probabilidad de transferencia aparece un poco incrementada frente los átomos de carbono, hidrógeno u oxígeno.

Por tanto, y en primera aproximación, se puede decir que una solución auosa de DNA se comporta como un

material homogéneo y que la probabilidad de absorción de energía, y por tanto de transformación de una molécula de una especie, depende de su proporción en peso respecto a las otras especies existentes en la solución irradiada.

En los estudios experimentales de radiolisis de soluciones acuosas de DNA normalmente suelen irradiarse soluciones muy diluidas ya que, debido a la gran viscosidad intrínseca de las soluciones de esta macromolécula, solo se puede hablar de homogeneidad en la solución cuando se tienen concentraciones inferiores a algún mg/ml. Por tanto, en las condiciones experimentales utilizadas normalmente, el DNA será un componente minoritario, ya que representa menos del 0,1% en peso frente al otro componente de la solución, el agua.

Al tener esto en cuenta, queda claro que la interacción de la radiación ionizante ocurrirá principalmente con las moléculas de agua, ocasionando su radiolisis. La transformación de las moléculas de DNA se deberán a una acción indirecta de la radiación, ya que serán producidas en su mayor proporción por reacción con los productos de la radiolisis de las moléculas de agua. Con esto no se pretende excluir la posibilidad de existencia de mecanismos de interacción directa entre las radiaciones ionizantes y las macromoléculas, sino solo admitir que la probabilidad de esos procesos de interacción directa es muy pequeña.

Al aceptar estas consideraciones, la acción de las radiaciones ionizantes sobre cualquier biopolímero en solución diluida se puede interpretar a través del conocimiento de las especies radiolíticas primarias del agua y de sus reactividades correspondientes frente al biopolímero.

En el esquema presentado en la Figura 1 extraído de un trabajo de revisión de las especies radiolíticas producidas en el agua⁽²⁵⁰⁾, aparecen representadas las distintas posibilidades de reacción que se pueden presentar a las especies radiolíticas primarias.

En el acto primario de la ionización con las moléculas de agua se produce el radical-ión postulado por Weiss^(252,253), H_2O^+ , cuya existencia es extremadamente corta⁽²⁵⁴⁾, ya que desaparece en menos de 10^{-14} segundos al reaccionar con las moléculas de agua según la reacción



originando una especie reactiva oxidante estable y sumamente activa, el radical OH^\cdot .

Otra posibilidad de desaparición del radical-ión H_2O^+ es por colisión con la otra especie primaria originada en la ionización, el electrón dotado de alta energía cinética. La recaptura del electrón por su ión gemelo H_2O^+ da lugar a moléculas de agua en estado excitado que pueden disociarse dando origen a radicales OH^\cdot , como los ya descritos anteriormente, y a una especie reductora, el radical H^\cdot .

Por su lado, el electrón originado en la ionización del agua, dotado de alta energía cinética, puede comportarse como partícula ionizante frente a nuevas moléculas de agua, mientras su energía cinética sea suficientemente alta para ello. Cuando su energía cinética disminuye, puede darse bien la recombinación iónica con el H_2O^+ que hemos descrito anteriormente, o bien su termalización por deslocalización entre un cierto número de moléculas de agua^(250,255). Esto último da lugar al electrón solvatado, e_{aq}^- . El electrón hidratado reaccio

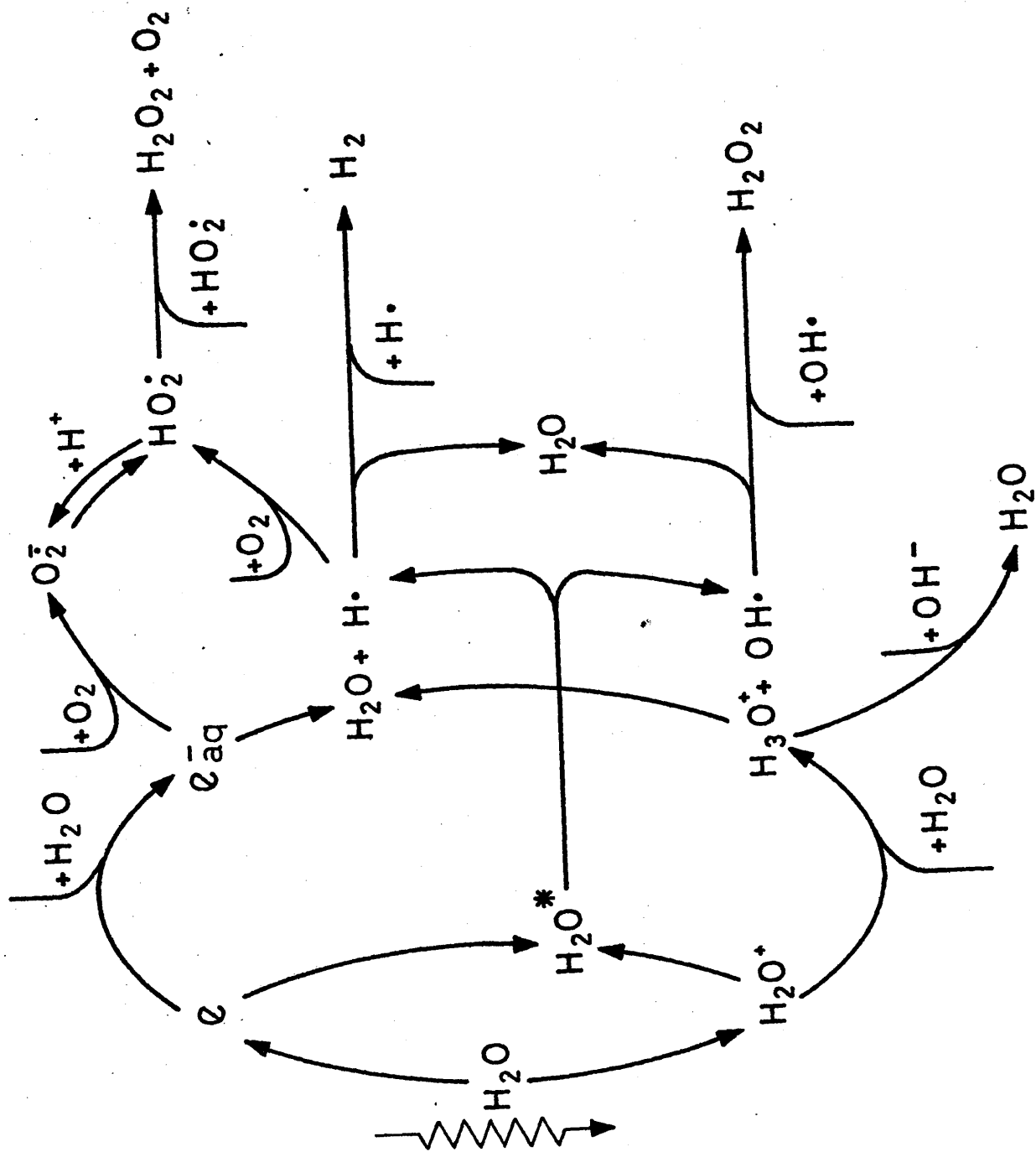
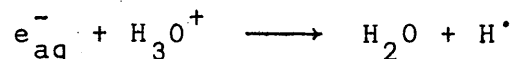


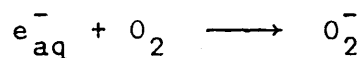
Figura 1.

na con los hidrogeniones H_3O^+ existentes previamente a la irradiación, si se trata de soluciones ácidas, o radioinducidas en ellas, en los demás casos, de acuerdo con la reacción:



dando lugar al radical H^\cdot , la única especie reductora con vida media suficientemente larga como para poder reaccionar con los solutos. En medio alcalino esta reacción queda inhibida, puesto que compite con ella la reacción de neutralización, de constante de velocidad aún mas alta, por lo que la especie reductora estable en este caso es el electrón hidratado.

Los electrones solvatados reaccionan con el oxígeno molecular disuelto en la solución, dando lugar a radicales-iones hidroperoxidos, de acuerdo con la reacción:



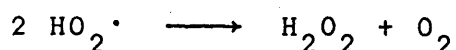
o a su radical conjugado, el hidroperoxido:



radical al que también se llega por reacción del oxígeno molecular con la otra especie reductora posible, el radical H^\cdot :



La vía de estabilización de este radical suele ser su recombinación con otro radical hidroperoxido, dando lugar a hidroperoxido de hidrógeno y oxígeno molecular:



Las reacciones del electrón solvatado con los hidrogeniones, H_3O^+ , y con el oxígeno presente en la solución son reacciones sin barrera de energía de activación, controladas solo por la velocidad de difusión de las especies reactivas. La vía de evolución de los electrones solvatados radioinducidos depende, por tanto, de las concentraciones existentes en la solución de oxígeno molecular y de hidrogeniones.

Podemos resumir de lo que venimos comentando que, salvo que la solución haya sido desgasificada antes de irradiar, las especies reductoras H^\cdot y electrón solvatado desaparecerán por reacción con el oxígeno disuelto, dando lugar a los radicales O_2^\cdot o HO_2^\cdot según el pH de la solución. Sin embargo, tanto la concentración de oxígeno molecular como el pH no afectan a la naturaleza de la especie reactiva oxidante, que siempre será el radical OH^\cdot .

Se puede resumir en la Tabla 1 (procedente del citado trabajo de revisión⁽²⁵⁰⁾) las especies radicales inducidas por las radiaciones ionizantes en el agua, según cuales sean las condiciones de pH y presencia o no de oxígeno molecular en la solución.

TABLA 1

ESPECIES RADICALES PRIMARIAS

	<u>Ausencia de O_2</u>	<u>Presencia de O_2</u>
MEDIO ACIDO	$\text{H}^\cdot \text{OH}^\cdot$	$\text{HO}_2^\cdot \text{OH}^\cdot$
MEDIO NEUTRO	$\text{e}_{\text{aq}}^- \text{H}^\cdot \text{OH}^\cdot$	$\text{O}_2^\cdot \text{OH}^\cdot$
MEDIO ALCALINO	$\text{e}_{\text{aq}}^- \text{OH}^\cdot$	$\text{O}_2^\cdot \text{OH}^\cdot$

Como el radical hidropéroxido tiene baja reactividad frente a los solutos orgánicos y no puede competir con el sistema mucho más oxidante constituido por el radical $\text{OH}\cdot$ ⁽²⁵⁶⁾, siempre que la solución se irradie sin una desgasificación previa, la única especie radical verdaderamente activa será la constituida por los radicales $\text{OH}\cdot$. Esta es una simplificación muy importante que permite una más fácil interpretación del mecanismo a través del cual se produce la degradación radiolítica del soluto ya que hay que tener en cuenta solo su reactividad frente a una sola especie radical.

I.2.2. RADIOLISIS DE LOS COMPONENTES DE ACIDOS NUCLEICOS.

El radical $\text{OH}\cdot$ suele presentar tres mecanismos típicos de reacción dependiendo de la naturaleza de las moléculas de soluto con las que interacciona, pasando en cualquiera de ellos a su forma estable reducida, el ión oxihidrilo, OH^- . Esta reacción redox presenta un potencial oxidante muy alto.

De los mecanismos de reacción del radical $\text{OH}\cdot$:

- a) reducción por transferencia electrónica, su mecanismo normal con los iones inorgánicos en general,
- b) la reducción por transferencia de átomos de hidrógeno, mecanismo de reducción típico del radical $\text{OH}\cdot$ con los solutos orgánicos saturados,
- c) reducción por adición a insaturaciones, su mecanismo de reacción con moléculas que poseen insaturaciones olefínicas,

queremos destacar el primero, porque constituye la base del sistema de dosimetría que hemos utilizado en la valoración de la dosis de radiación y absorbida por las soluciones de DNA, y comentar con algún detalle el último, por ser el que se produce en su reacción con los componentes de los ácidos nucleicos.

La observación del esquema presentado en la Figura 2, extraído igualmente de la revisión citada⁽²⁵⁰⁾, nos permite comentar el mecanismo mas importante de actuación del radical OH· sobre las bases componentes de los ácidos nucleicos. El radical se adiciona a un doble enlace de la base dando lugar a un radical hidroxiderivado cuya evolución posterior depende de las condiciones del medio⁽²⁵⁷⁾. En esta figura se esquematizan algunas de las rutas de reacción que son posibles para el radical hidroxiderivado formado al producirse la adición de un radical OH· al doble enlace 5, 6 de una pirimidina.

Estos radicales pueden recombinarse regenerando el doble enlace, pero en presencia de un gran exceso de radicales OH·, el radical hidroxiderivado de la pirimidina formado adiciona un segundo radical OH· dando lugar a un glicol, que puede eventualmente evolucionar perdiendo una molécula de agua y produciendo isobarbitúricos. Si en la solución existe oxígeno molecular disuelto, el radical hidroxiderivado de la pirimidina evoluciona hacia la formación de un hidroxihidroperoxiderivado. Este es el caso de mayor simplicidad de reacción. De todas formas, aun en presencia de oxígeno en la solución, estos hidroxihidroperoxiderivados no pasan de ser productos radioinducidos mayoritarios, pero no son nunca exclusivos. Concretamente, y a partir del rendimiento radiolítico de destrucción de pirimidinas y de el de producción de aquellos derivados, se deduce que estos últimos representan del orden de la mitad de todos los productos ra-

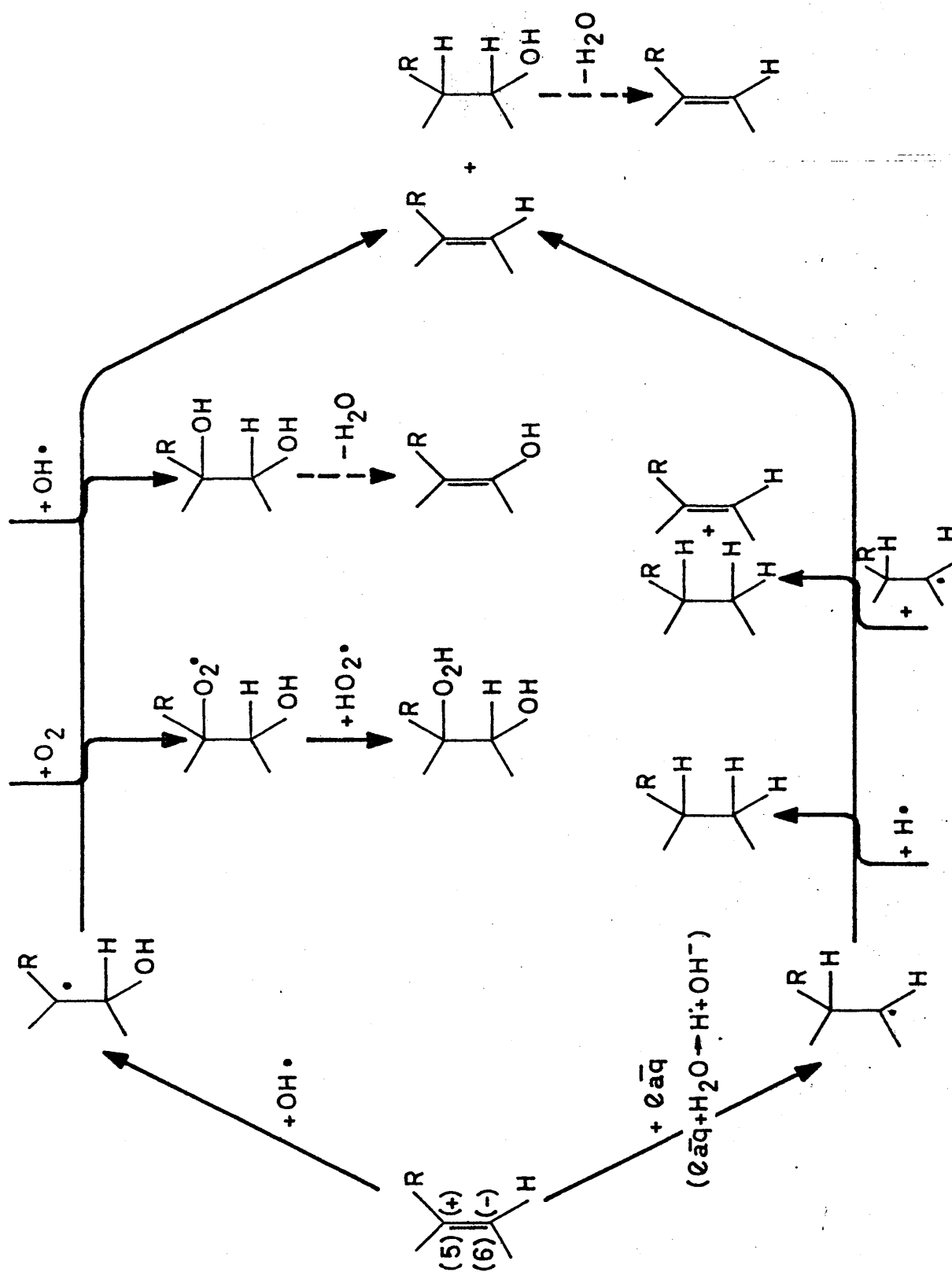


Figura 2

dioinducidos⁽²⁵⁸⁾. No existe un criterio único en la pos
tulación de los otros derivados posibles y menos aún de
los mecanismos posibles que les pueden dar lugar por ata
que del radical OH \cdot .

La situación es todavía mas confusa en lo que res
pecta a la radiolisis de las purinas. Parece, sin embargo,
establecido que en este caso el radical OH \cdot , en presencia
de oxígeno molecular en la solución, se adiciona
al doble enlace internuclear, dando origen, por posterior
adición de oxígeno, a un radical hidroxihidroperoxidoderivado^(259,260).

En cuanto a si hay diferencias de reactividad frente
al radical OH \cdot entre las bases púricas y pirimidínicas,
tampoco existen datos concluyentes. Muchos de los valores
dados en la literatura para las constantes de velocidad
de reacción para la oxidación de las bases componentes del
DNA por el radical OH \cdot son del mismo orden de magnitud,
tanto si se encuentran en forma de bases libres como si
están en forma de nucleosidos o nucleotidos. Sin embargo,
se ha querido reconocer diferencias de reactividad entre
bases púricas y pirimidínicas⁽²⁶¹⁾. En apoyo de esto último
están los datos obtenidos últimamente en el laboratorio
de Biofísica de la J.E.N., los cuales dan, en las
condiciones experimentales que venimos comentando, una
diferencia de reactividad de 2 a 2.5 veces entre bases
púricas y pirimidínicas.

Si existiesen realmente diferencias de reactividad
entre las bases frente a un ataque del radical, esto
se pondría de manifiesto en un ataque preferencial del
radical en puntos concretos de la macromolécula. Sin embargo,
el que el biopolímero presente un número muy gran
de de bases hace que la distribución de éstas sobre la
macromolécula de DNA puede considerarse como al azar desde

de el punto de vista macromolecular; como, además, la distribución de radicales la podemos considerar homogénea, podemos llegar a la conclusión de que el ataque radical tiene lugar en un punto al azar de la molécula.

I.2.3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA RUPTURA SIMPLE RADIO-INDUCIDA.

El que no exista un conocimiento completo de los productos de radiolisis incluso en el caso mas simple de las bases libres, junto con la evidencia de que existe un sistema complejo de reacciones competitivas con fuerte dependencia de la concentración y del intervalo de dosis, hacen que no estén claros los mecanismos por los que se produce la alteración radioinducida, de que forma se afectan las bases, hasta que punto estas quedan alteradas y de que manera su destrucción puede afectar tanto a la continuidad de la propia cadena polinucleotídica como a la de un DNA que se sintetizase actuando ella de molde.

Los datos experimentales extraídos de la literatura parecen indicar que, al menos en el caso del hidroxihidroperoxi-derivado de la timina, la saturación del doble enlace 5,6 por adición del radical $\text{OH}\cdot$ no necesariamente induce a la hidrolisis del enlace N-glucosídico, que, en el caso de formar parte la timina de un nucleosido o un nucleotido, aparece establecido entre el nitrógeno 1 de la pirimidina y el carbono 1' de la desoxiribosa. Estos datos son de extrema importancia para la interpretación del mecanismo de ruptura internucleotídica. Por otra parte, se ha comprobado que los hidroxihidroperoxi-derivados de la timina permanecen unidos a la cadena polinucleotídica en el caso de irradiación de DNA, por lo que son precipitables en medio ácido a partir de la solución irradiada⁽²⁶²⁾. Según estos

datos, parece que no existe necesariamente una relación causa-efecto entre la alteración inducida por las radiaciones en las bases y la producción de roturas internucleotídicas.

Si las bases no son responsable, al menos en su mayor parte, de las rupturas internucleotídicas observadas en la degradación radiolítica de DNA, estas pueden ser atribuibles a alteraciones en el azúcar o a ataques directos al enlace fosfodister. De los datos recogidos de la literatura parece desprenderse una gran importancia, en lo que a interpretación mecanística de la ruptura internucleotídica se refiere, del ataque de la desoxirribosa por las especies radicales.

El azúcar es atacado tanto por el radical reductor, para el cual la desoxirribosa presenta muy baja reactividad⁽²⁶³⁾, como por la especie oxidante, el radical OH·. Esta última reacción se encuentra evidenciada, en el caso de nucleótidos, por la liberación de ortofosfato inorgánico, que no tendría lugar si el ataque radical tuviese lugar en la base, tanto en el caso de que de esa forma se labilice el enlace N-glucosídico como en el contrario.

La relación entre los rendimientos radiolíticos de destrucción de bases y del azúcar induce a decir que el 37%⁽²⁶⁴⁾ o el 27%⁽²⁶⁵⁾ de los ataques radicales tienen lugar en el azúcar componente de la molécula del nucleótido. Utilizando esta forma de expresión se puede inducir erróneamente a pensar que pudiera existir algún ataque selectivo por parte del radical, cuando en realidad no es mas que una consecuencia de la distinta reactividad de ambos componentes del nucleótido. Cuando el ataque del radical tiene lugar en la base, presente un 80% de probabilidad de ser eficaz, mientras que si el

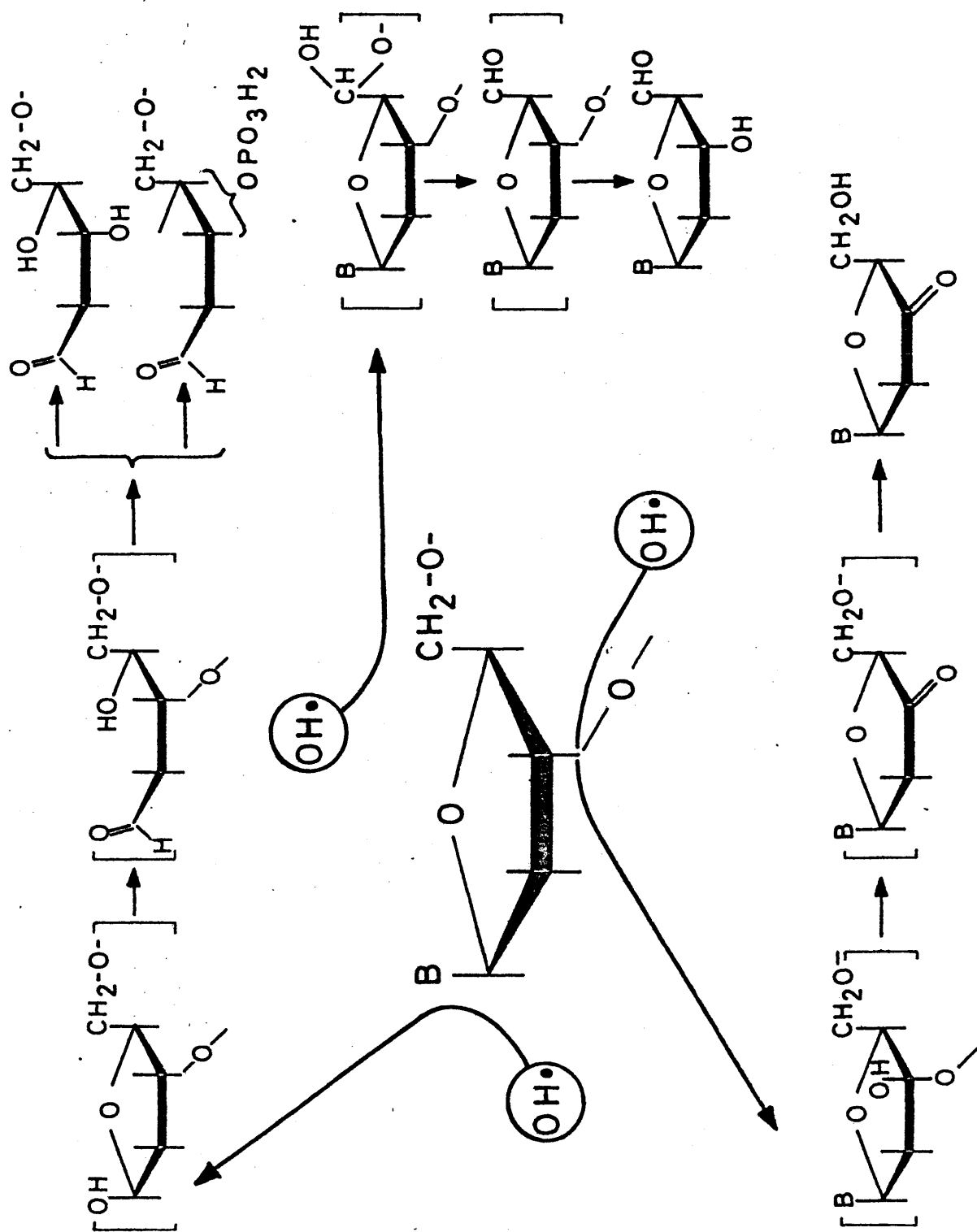


Figura 3

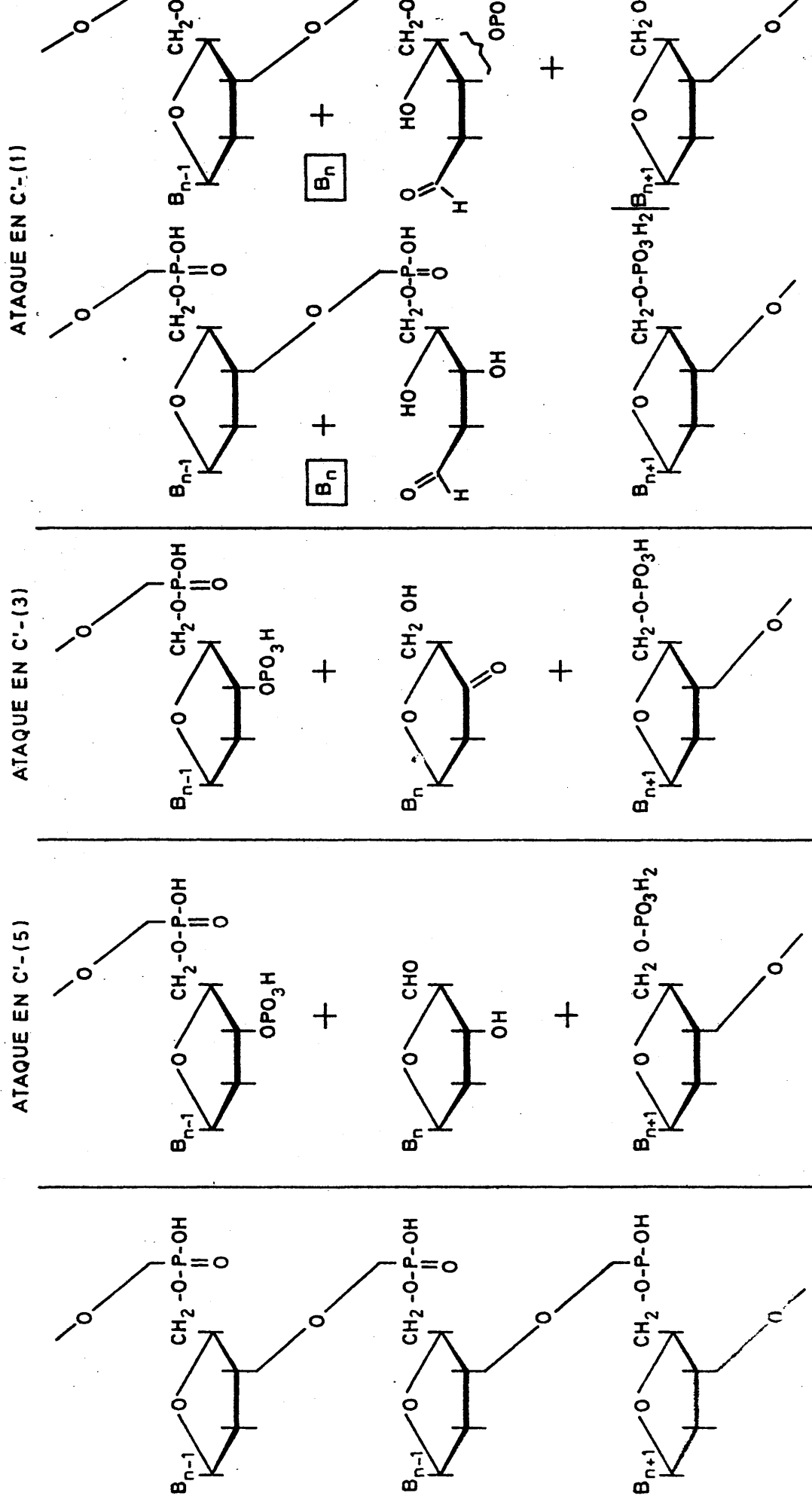
ataque radical se produce en el azúcar, presentará solo un 20% de probabilidad de transformación⁽²⁵⁰⁾.

Es muy sorprendente que no existan datos en la literatura sobre intentos de interpretación mecanística de la ruptura internucleotídica. Solo existe una ligera referencia de Scholes⁽²⁵⁸⁾ a la reconocida inestabilidad de los ésteres fosfóricos de los β -ceto y β -aldehído alcoholes frente a la hidrólisis⁽²⁶⁶⁾. En esta interpretación, la hidrólisis del éster fosfórico del azúcar se podría explicar por la oxidación del carbono en posición 3' por el radical $\text{OH}\cdot$, ya que al formar un grupo carbonilo en posición β respecto al OH existente en el C-(5'), se inducirá la hidrólisis del enlace éster. En la Figura 3, extraída de la revisión comentada⁽²⁵⁰⁾, aparece esquematizado este mecanismo, así como el que se produciría en el caso de que la alteración de la base supusiera la hidrólisis del enlace N-glucosídico; igualmente aparece esquematizado en ella el caso de que el ataque del radical se realice en el carbono en posición 5' del azúcar.

En la Figura 4^(*) aparecen tabuladas las diferentes vías de producción de la ruptura del enlace internucleotídico según el enlace específico del azúcar donde se realice el ataque del radical $\text{OH}\cdot$, presentando el estado final en que quedan los extremos de cadena ocasionados por la ruptura y los productos liberados en cada uno de los casos según supongamos cual sea el lugar donde se realiza la oxidación por el radical $\text{OH}\cdot$. Observamos que, en caso de suponer un ataque en el carbono 5' del azúcar, se produce liberación de un nucleosido alterado quedando

(*) Figura extraída de una revisión sobre la ruptura internucleotídica radioinducida⁽²⁵⁰⁾.

Figura 4



los dos extremos originados con sendos grupos fosfatos, uno en posición 3' del azúcar y otro en posición 5'. Cuando la oxidación por el radical se realice en posición 3' del azúcar los extremos de cadena originados quedarán igualmente con grupos fosfatos en posiciones 3' y 5', liberándose al mismo tiempo nucleosidos alterados. Si la alteración se produce inicialmente en el carbono 1', las dos rutas posibles de evolución de la alteración conducen a creación de extremos con grupos diferentes. Una de ellas lleva a la aparición de un grupo fosfato en posición 5' en uno de los extremos y un grupo OH en posición 3' del azúcar del otro extremo, azúcar que aparece completamente alterada por oxidación intensa del carbono en posición 1'. La otra ruta conduce a la aparición de un extremo con grupo OH en posición 5', resultando el otro extremo completamente alterado ya que, no solamente el C-(1') del azúcar ha sido fuertemente oxidado, sino que aparece un grupo fosfato ciclando las posiciones 3' y 4' del azúcar.

De los valores de rendimiento radiolíticos recogidos de la literatura⁽²⁶⁷⁾ se puede deducir que el 80% de las rupturas de enlace internucleotídicos radioinducidos van acompañadas por la aparición de terminales con grupos fosfato en posición 5' en el polinucleotido resultante. Igualmente se deduce que en un 30% de estos casos, aparecen bases libres simultáneamente con la creación de dichos terminales, y que en el restante 30% de los casos se observa la liberación de nucleosidos alterados. De estos datos ha podido ser concluido⁽²⁵⁰⁾ que las rutas de reacción esquematizadas en la citada Figura 3 son aproximadamente equivalente en eficacia, con lo que entre todos justificarían el 80% de los casos de aparición de terminales fosfato en posición 5'. Hay indicios⁽²⁵⁰⁾ de existencia de otra vía de reacción en la que se liberan los nucleosidos intactos y que represen-

ta el 20% de los casos de formación de terminales fosfatos en 5', aunque, hasta el momento, no se haya conseguido proponer mecanismos para ella.

No tenemos, por tanto, ninguna razón para pensar en la aparición de nuevos extremos con grupos OH en posición 3' del azúcar, ya que cualquiera de las vías comentadas que conduce a la ruptura de un enlace internucleotídico no dejan grupos OH libres en posición 3', a no ser una de las posibles alteraciones que parten de la oxidación del carbono en 1', pero en la que el azúcar al que aparece unido el grupo OH está completamente alterada.

Hasta que punto la alteración del azúcar, o la alteración de las bases que no conducen a ruptura del enlace internucleotídico, modifican la capacidad del polinucleótido resultante a enlazarse a la DNA Polimerasa, es un punto difícil de aclarar con solo los datos existentes en la literatura. Parece lógico que un grupo OH unido en posición 3' a un azúcar alterado encaje difícilmente en el lugar del centro activo de la enzima reservado para enlazar el extremo de la cadena iniciadora en una polimerización. Por otro lado, parece lógico que una vez iniciada la polimerización, la existencia de una base alterada en la cadena molde interrumpa la síntesis del polímero, ya que difícilmente formará puentes de hidrógeno con la base del nucleótido últimamente incorporado resultando un extremo iniciador inepto para una nueva adición de monómero. Sin embargo, no tenemos pruebas concluyentes para ninguna de estas suposiciones y, por tanto, no nos podemos mover mas allá de las conjeturas. Como veremos en el desarrollo de este trabajo, la incorporación de estas suposiciones nos lleva a una expresión teórica con un buen acuerdo con los datos experimentales, razón por la cual nos permitimos utilizarlas en

nuestro razonamiento.

Otro punto importante para nuestro razonamiento, y del cual tampoco hemos podido obtener datos concluyentes de la literatura, es el de la extensión de la desestabilización causada en la estructura doblehelicoidal por cualquiera de las alteraciones radioinducidas en la macromolécula. Parece razonable que la alteración de una base, por efecto del radical, conduzca o no a la rotura del enlace internucleotídico, desestabilice la doble helice en un entorno ya que la posibilidad de formación de enlaces de hidrogenos entre las bases antiparalelas quedaría muy disminuida. Sin embargo, se tienen datos muy poco claros a este respecto en la literatura y los que se poseen han sido obtenidos por vías de aproximación distintas a las de mecanismos de reacción posibles, como comentaremos en el apartado I.5.

I.3. DEGRADACION ENZIMATICA DEL DNA POR DNasa.

Hemos creído conveniente la utilización de la degradación del DNA por incubación con DNasa para nuestro estudio, por considerar que, al ser perfectamente conocidos tanto el mecanismo de actuación de la enzima como el efecto producido sobre la macromolécula, podría servir de método de referencia para interpretar el tipo de alteración producido en el DNA por la radiolisis, a través de la comparación de sus repercusiones respectivas sobre la capacidad como molde para la polimerización frente a la DNA Polimerasa.

Brevemente comentaremos algunas de las ideas generalmente aceptadas sobre la degradación producida en el DNA por tratamiento con DNasa, centrándonos en dos puntos de gran interés para este estudio, cómo es la altera

ción local producida en la macromolécula y la aleatoriedad del lugar de ataque del reactivo sobre el biopolímero.

I.3.1. ACCION DE LA DNasa I PANCREATICA.

Del conjunto de enzimas conocidas bajo el nombre genérico de DNasa, en este comentario nos referiremos concretamente a la DNasa I (E.C. 3.1.4.5), obtenida del páncreas, por ser la enzima hidrolítica utilizada en este estudio.

Se sabe que esta enzima, como otras enzimas hidrolíticas, es capaz de actuar sobre las soluciones de DNA altamente polimerizado disminuyendo su viscosidad y aumentando su absorción específica a la luz ultravioleta. En la hidrólisis se liberan grupos ácidos, fácilmente valorables, sin que se produzca liberación, en cambio, de grupos fosfato⁽²⁶⁸⁾. Los productos de la hidrólisis exhaustiva de DNA no son precipitables por ácidos, (perclórico, (PCA), o tricloroacético, (TCA)), o alcohol (etanol) y difunden a través de membranas de colodión o celofane^(268,269). La hidrólisis se produce tanto en soluciones de DNA doble helicoidal altamente polimerizado como de DNA desnaturado⁽²⁷⁰⁾ y se sabe⁽²⁷¹⁾ que, hasta cierto punto, el grado de polimerización del DNA no influye esencialmente en el ritmo y grado de la acción de esta DNasa, aunque la enzima es incapaz de actuar sobre oligonucleótidos de cadenas menores de 7 unidades nucleotídicas⁽²⁷²⁾ y prefiere un DNA de doble cadena sobre otro de cadena simple. Cuando la concentración de sustrato es baja, la hidrólisis transcurre aproximadamente como una reacción de primer orden⁽²⁷³⁾, siendo la constante de velocidad independiente de la concentración de la enzima. A concentraciones mayores de sus-

trato, la velocidad inicial de la reacción disminuye rápidamente al incrementar la concentración de sustrato (273,274).

Esta enzima actúa como una endonucleasa, produciendo la hidrólisis del enlace internucleotídico en puntos interiores del biopolímero. Actúa directamente sobre el enlace fosfodiester, liberando, cuando actúa exhaustivamente, mezclas complejas de oligonucleotidos de composición variable, desde estar constituidos por un nucleotido (poco frecuente^(269,270)) hasta estar constituidos por siete-ocho unidades monoméricas⁽²⁷⁰⁾. Si se interrumpe la actuación de la enzima, desnaturándola o por acción de algún inhibidor, se observa la existencia de una mezcla de mono-, oligo- y polinucleotidos de doble cadena con gran número de enlaces internucleotídicos rotos como productos de la hidrólisis⁽²⁶⁹⁾.

I.3.2. ESPECIFICIDAD DEL ATAQUE ENZIMATICO.

Al degradar exhaustivamente una solución de DNA con esta enzima, se produce una fracción no degradable de oligodesoxinucleotidos en los que la relación A/G, T/C y Pu/Pi (Pu = bases púricas, Pi = bases pirimidínicas) es mayor que la de los DNA de partida^(275,276). Esto indicaría que la unión internucleotídica entre un nucleotido con purina y un nucleotido con pirimidina es particularmente susceptible a la hidrólisis con la DNasa. Datos experimentales posteriores⁽²⁷²⁾ parecen señalar que los enlaces internucleotídicos con grupos fosfatos unido al carbono 3' de un nucleotido con adenina y al carbono 5' de cualquier otro nucleotido es relativamente resistente a la hidrólisis con DNasa I, ya que menos del 5% de los OH en posición 3' terminales contienen adenina. Sin embargo, el desoxipolinucleotido d(A - T)

es mas degradable que el DNA, pudiéndose llegar hasta oligonucleotidos de cuatro unidades monoméricas⁽²⁷²⁾. En cambio, el polinucleotido sintético de doble cadena (dG) : (dC) es muy resistente a la hidrolisis. Trabajos mucho mas recientes⁽²⁷⁷⁾ ponen de manifiesto la preferencia de la enzima por enlaces formados entre nucleotidos de pirimidinas con grupo fosfatos unido al carbono en posición 3' del azúcar y nucleotidos de purina con el grupo fosfato unido al carbono en posición 5'.

Por tanto, aunque parece que con la DNasa I ocurre algo semejante a lo que está probado para la RNasa de que actúa predominantemente sobre un tipo de enlace internucleotídico⁽²⁷⁸⁾, no está muy clara la correlación entre secuencia de bases en el DNA y los puntos de ataque en él de la DNasa.

Por otro lado, Thomas⁽²⁷⁹⁾ en un trabajo donde determina el número de enlaces rotos por acción de la DNasa sobre soluciones de DNA mediante valoración de los iones H^+ liberados en la reacción de roturas de enlaces fosfodiester, obtiene un buen ajuste con expresiones teóricas del tipo de las de Charlesby⁽²⁸⁰⁾, deducidas suponiendo que la distribución de lugares donde se produce la ruptura del enlace internucleotídico es al azar. Mediante determinación simultánea sobre la misma muestra de su viscosidad, llega a la determinación experimental del número de roturas de enlace internucleotídicas por moléculas producidas para reducir la viscosidad a la mitad. La expresión que utiliza para el cálculo del número de fracturas por molécula es la siguiente, si la rotura es al azar pero la muestra es originalmente polidispersa al azar, como es nuestro caso

$$\frac{M(p)}{M} = \frac{1}{1 + \frac{1}{3} \gamma^3}$$

donde p es la probabilidad de rotura por enlace, $M(p)$ es el peso molecular medio cuando existe una probabilidad p de rotura por enlace, M es el peso molecular medio original y γ es el número medio de fracturas por molécula original.

El buen ajuste a los datos experimentales obtenidos por Thomas al utilizar la suposición de ataque al azar hace pensar que la acción de la DNasa, al menos en el aspecto macromolecular, no muestra ninguna selectividad. Esto, unido al hecho de que los datos experimentales respecto a una selectividad en el ataque para determinados enlaces internucleotídicos no son concluyentes, nos ha hecho preferir utilizar la suposición de Thomas de ataque al azar de la DNasa apoyándonos en la idea de que aún en el caso de que existiese realmente esa selectividad en el ataque, la distribución de las cuatro bases sobre la molécula de DNA puede, desde el punto de vista macromolecular y dada la presencia de gran número de monómeros constituyendo la macromolécula, considerarse como al azar. Como comentaremos posteriormente este punto es de gran importancia para nuestro estudio, ya que nos va a permitir utilizar los resultados de la simulación del ataque al azar de un reactivo capaz de producir rupturas internucleotídicas sobre las dos cadenas de un homopolímero⁽²⁵⁰⁾.

I.3.3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA RUPTURA SIMPLE PRODUCIDA POR DEGRADACION ENZIMATICA.

Los productos de la hidrólisis enzimática de DNA por la DNasa I pancreática se caracterizan por poseer un grupo fosfato terminal unido al carbono en posición 5' del azúcar y un grupo OH terminal que permanece unido al carbono 3' del azúcar del otro extremo liberado⁽²⁷²⁾.

Los datos experimentales obtenidos de la literatura sobre cantidad de fosfatos terminales en el extremo 5' producidos durante la degradación exhaustiva de una muestra de DNA indican que estos representan alrededor del 25% del fósforo total^(269,281). Si se supone que el único camino de hidrólisis del enlace internucleotídico por el que transcurre la degradación es el que conduce a la liberación de grupos fosfatos en posición 5', se puede calcular la longitud media aproximada de los fragmentos producidos, valor que resulta muy próximo a los encontrados experimentalmente, lo cual respalda la idea, generalmente aceptada, de que el único camino de hidrólisis es aquél que origina grupos fosfato terminales en posición 5'.

En ninguno de los trabajos revisados de la literatura existente a este respecto se ha encontrado sospechas o datos de que se haya detectado grupos terminales distintos de los fosfatos en posición 5' y los oxihidrilos en 3' en los productos de la hidrólisis, tanto exhaustiva como parcial, de una muestra de DNA por acción de la DNasa I pancreática. Igualmente, tampoco se han encontrado datos sospechosos de posibles alteraciones en las bases o en el azúcar de los fragmentos producidos. Por tanto, se puede afirmar, tal como por otra parte es reconocido generalmente, que la única vía de degradación en este caso es la hidrólisis específica del enlace entre el grupo fosfato, unido al carbono en posición 5' del azúcar de la unidad monomérica n, y el carbono en posición 3' del azúcar de la unidad n-1.

I.4. DEGRADACION MECANICA DEL DNA.

Uno de los métodos de degradación de DNA utilizados en el desarrollo de este trabajo ha sido el tra-

tamiento de soluciones del biopolímero mediante un homogenizador de cuchillas de alta velocidad.

Nos proponemos comentar en este capítulo brevemente algunas de las ideas generalmente aceptadas acerca del tipo de alteración experimentada por la macromolécula por causa de este tratamiento. Para ello, en primer lugar, vamos a comentar el mecanismo a través del cual se produce la pérdida de peso molecular observada en el biopolímero para después resumir brevemente las ideas actuales acerca de la estructura química de la fractura producida, a fin de conocer su repercusión sobre la capacidad como molde para la polimerización de las muestras degradadas frente a la DNA Polimerasa.

I.4.1. ACCION DE LAS FUERZAS TANGENCIALES SOBRE EL DNA.

Por lo que se conoce sobre la actuación de la agitación a altas velocidades de soluciones de biopolímero se puede afirmar que no se trata de un ataque químico localizado, por algún agente activo originado directa o indirectamente a causa del tratamiento, sobre la macromolécula⁽²⁸²⁾. Por tanto, podemos pensar que, previsiblemente, ese tratamiento degradativo no dará lugar a la producción de rupturas simples sobre las cadenas. Por otro lado, las turbulencias locales originadas por la agitación a altas velocidades dan lugar a un conjunto de fuerzas tangenciales que actúan mecánicamente sobre las macromoléculas que se encuentren en el seno de la solución produciendo su fractura de forma análoga a la que se realizaría con una varilla sometida a fuerzas de cizalla. Es, por consiguiente, previsible que la fractura de la doble hélice, y por tanto la pérdida de peso molecular, se lleve a cabo por la ruptura simultánea de enlaces internucleotídicos enfrentados en las dos cadenas, es decir, por la pro

ducción directa de la rotura doble, debido a que la tensión originada en algún punto de la macromolécula por las fuerzas tangenciales que actúan sobre ella debilita la unión internucleotídica.

Un mecanismo de degradación cuya actuación es, en cierta manera, paralela a la del que venimos comentando, es la degradación de soluciones de DNA mediante ultrasonidos. Se conoce perfectamente que la transmisión de las ondas sónicas produce en la solución diferencias brutales de presión en puntos muy próximos localizados en la solución, dando lugar a fuerzas de cizalla sobre las macromoléculas que se encuentran en su seno⁽²⁸³⁻²⁸⁵⁾. Se sabe que en el caso de utilización de ultrasonido de energías elevadas, se produce la aparición de radicales libres en la solución⁽²⁸⁶⁾, debido al proceso de cavitación originado en la solución. La existencia de estos radicales fue comprobada experimentalmente por análisis de radicales oxidantes. Sin embargo, la producción de radicales en la sonicación de soluciones acuosas solo se consigue con cierta probabilidad en condiciones realmente drásticas.

Es por tanto, previsible que en las condiciones experimentales utilizadas en nuestro estudio, no se produzca la aparición de radicales libres en las soluciones tratadas con el homogenizador, ya que las energías transmitidas en estos casos son muchísimo menores que aquéllas a las que se consigue la producción de radicales por sonicación. En el caso de sonicar la solución acuosa, la agitación térmica producida es muy grande por la implosión de las burbujas originadas, cosa que no ocurre en la agitación a altas velocidades.

Por consiguiente, creemos poder afirmar que en el transcurso de la degradación por tratamiento con el

homogenizador el único mecanismo previsible es la ruptura mecánica del biopolímero produciendo directamente la rotura doble de las cadenas^(283,287).

Es interesante constatar que el método degradativo para la producción de cortos fragmentos doble helicoidales de DNA mas generalizado en la literatura es la sonicación. Sin embargo, nosotros hemos preferido utilizar la degradación por el homogenizador por encontrarle ventajas en la reproductibilidad de las degradaciones y evitar el inconveniente del calentamiento producido en la solución.

Se pueden aportar comprobaciones experimentales que respalden la idea generalmente aceptada de que la degradación por la agitación a altas velocidades se realizan mecánicamente y no por la producción de roturas simples en las cadenas.

Por un lado se conoce que, cuando la degradación se produce por la creación de roturas simples en las cadenas, la cinética de evolución de las fracciones moleculares discurre a través del predominio sucesivo de fracciones de peso molecular cada vez menor según el grado de tratamiento aplicado, como se puede ver en la Figura 5. La existencia de este tipo de cinética tiene su justificación teórica en la expresión de probabilidad de rotura doble obtenida por Mingot a partir de los datos de simulación de un proceso de degradación por ataque al azar de un reactivo sobre las cadenas de un homopolímero⁽²⁵⁰⁾.

Sin embargo este fenómeno no se presenta en las cinéticas obtenidas cuando la degradación se realiza por agitación a alta velocidad, como puede verse en la Figura 18, (que aparece incluida en el capítulo de resulta-

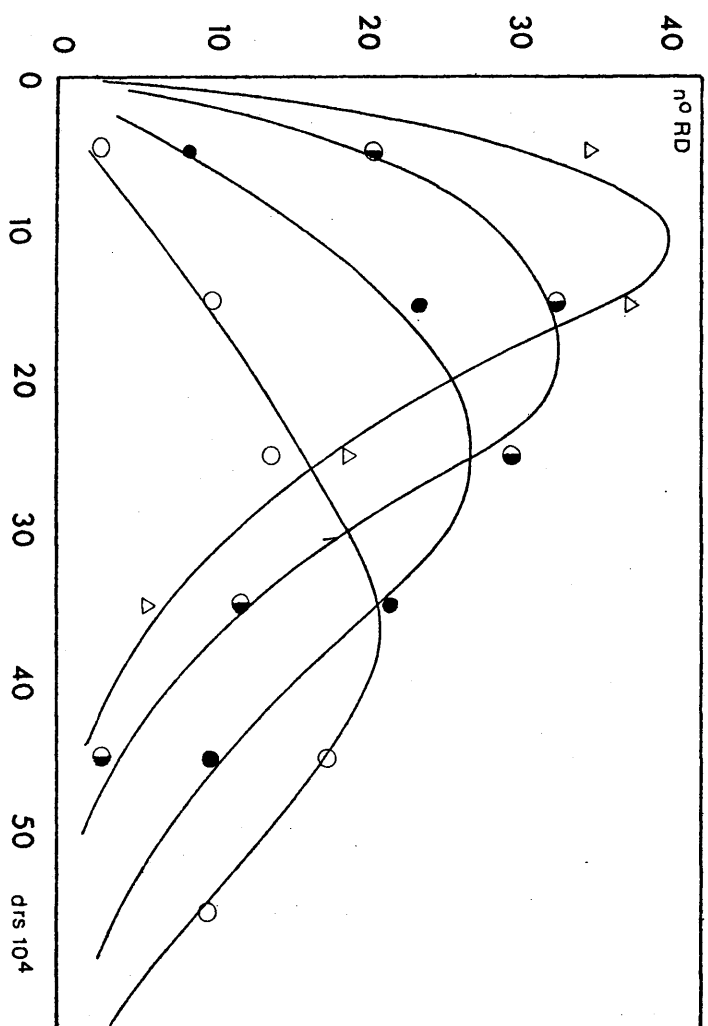


Figura 5

dos), dónde se produce la degradación solo de las fracciones de peso molecular mas alto aumentado, ya desde el principio, la proporción de DNA en fracciones de peso molecular menor, fenómeno que permanece estabilizado después de un tiempo de tratamiento para una determinadas condiciones de fuerza de cizalla y concentración de la solución de DNA.

Por otro lado, y según datos obtenidos en nuestro laboratorio, se sabe que en una solución de DNA degradada mediante un mecanismo productor de rupturas simples, como es la radiolisis, hasta pesos moleculares del orden del millón de Daltons, no precipita apreciablemente ni en ácido perclórico, (PCA 0,2 N), ni en etanol frio al 50%, ni en isopropanol. Sin embargo, pruebas análogas realizadas con soluciones de DNA degradadas hasta valores de peso molecular del mismo orden mediante el homogenizador, dan valores de precipitabilidad del 70% con etanol frio al 50% o de precipitabilidad completa con PCA 0,2 N. Esto nos induce a pensar en la integridad de la doble hélice en los fragmentos cortos de DNA originados por la degradación mecánica.

Una tercera prueba que confirma la idea de un mecanismo de degradación en la agitación diferente al de producción de rupturas simples, es la comparación de las variaciones experimentadas en la curva de transición de soluciones de DNA según sean degradadas por un método productor de rupturas simples o por agitación a alta velocidad. Se puede observar (ver Figuras 7 y 8, incluidas en el capítulo de resultados), que una degradación que actúe produciendo rupturas simples, tales como la radiolisis o la degradación por DNasa, produce una modificación importante en la curva de transición. Cuando la muestra se degrada hasta una fracción de peso molecular no superior a 10^6 Daltons, si la degradación se

realiza por radiólisis o incubación con DNasa se observa un importante desplazamiento de la curva hacia zonas de temperaturas mas bajas, alargándose mucho el intervalo de temperaturas en el que produce la transición, disminuyendo además, la magnitud del efecto hipercrómico observado. Este último efecto solamente se produce en muestras de DNA muy degradadas, como pondremos de manifiesto en el capítulo de resultados donde se estudiarán estos datos con mayor detalle. El alargamiento del intervalo de temperaturas en que se produce la transición puede interpretarse como una pérdida de cooperatividad en la transición consecuencia de las rupturas simples producidas; el incremento del número de rupturas simples podría contribuir a este efecto de una forma cinética ya que aumenta el número de extremos de cadena dónde se inicia el desovillamiento y disminuye la longitud del fragmento de cadena que debe desnaturarse; aunque también debe tenerse en cuenta que induce una desestabilización en un determinado segmento favoreciendo su desnaturación a menores temperaturas. Vemos, por tanto, que una variación de ese tipo en la curva de transición de muestras de DNA degradadas responde típicamente a degradaciones cuyo mecanismo de actuación sea por producción de roturas simples en las cadenas.

Sin embargo, cuando la degradación de la muestra de DNA se realiza por tratamiento con el homogenizador la curva de transición correspondiente no muestra ninguna de las modificaciones comentadas, resultando perfectamente superponible con la de la muestra de DNA sin degradar ya que la muestra degradada presenta el mismo efecto hipercrómico y la transición se realiza en el mismo intervalo de temperaturas, manteniendo constantes las condiciones de experimentación, como aparece en la Figura 9 (incluida, como las anteriormente citadas, en el capítulo de resultados). Esto nos lleva a concluir que el mecanismo de actuación de la degradación en este caso es

distinto, es decir, no actúa produciendo rupturas simples.

En la Figura 6 se presenta el resultado de otra experiencia que apoya la conclusión anterior. Se comparan en esta experiencia las características en la sedimentación en gradiente de sacarosa de dos soluciones de DNA alteradas por diferentes procedimientos: una degradada por medio del homogenizador y la otra irradiada de manera que su peso molecular sea superior al de la muestra tratada mecánicamente. Esto queda reflejado en la sedimentación en gradiente neutro, donde el pico correspondiente al DNA degradado por gamma, aparece en las fracciones de mayor concentración de sacarosa. Cuando ambas soluciones de DNA se sedimentan en un gradiente alcalino, en condiciones de desnaturalización, se observa que, debido a las roturas simples existentes en el DNA degradado por radiación gamma, las cadenas simples de DNA irradiado presentan menor tamaño ya que el pico correspondiente aparecen ahora en las fracciones de menor concentración de sacarosa. En la sedimentación en gradiente neutro, la existencia de rupturas simples en las cadenas del DNA irradiado no se pusieron de manifiesto ya que la muestra conservaba, a pesar de ellas, la estructura doble hélice. En cambio, en condiciones de desnaturación, la existencia de roturas simples en la macromolécula produce la separación de cadenas de peso molecular mucho más pequeño que el previsible.

Si la degradación mecánica actuase, análogamente a la irradiación, por producción de roturas simples, se podría prever la aparición, en condiciones de desnaturación, de cadenas de peso molecular mucho más pequeñas que los obtenidos por desnaturación de DNA irradiado, contrariamente a los resultados experimentales obtenidos.

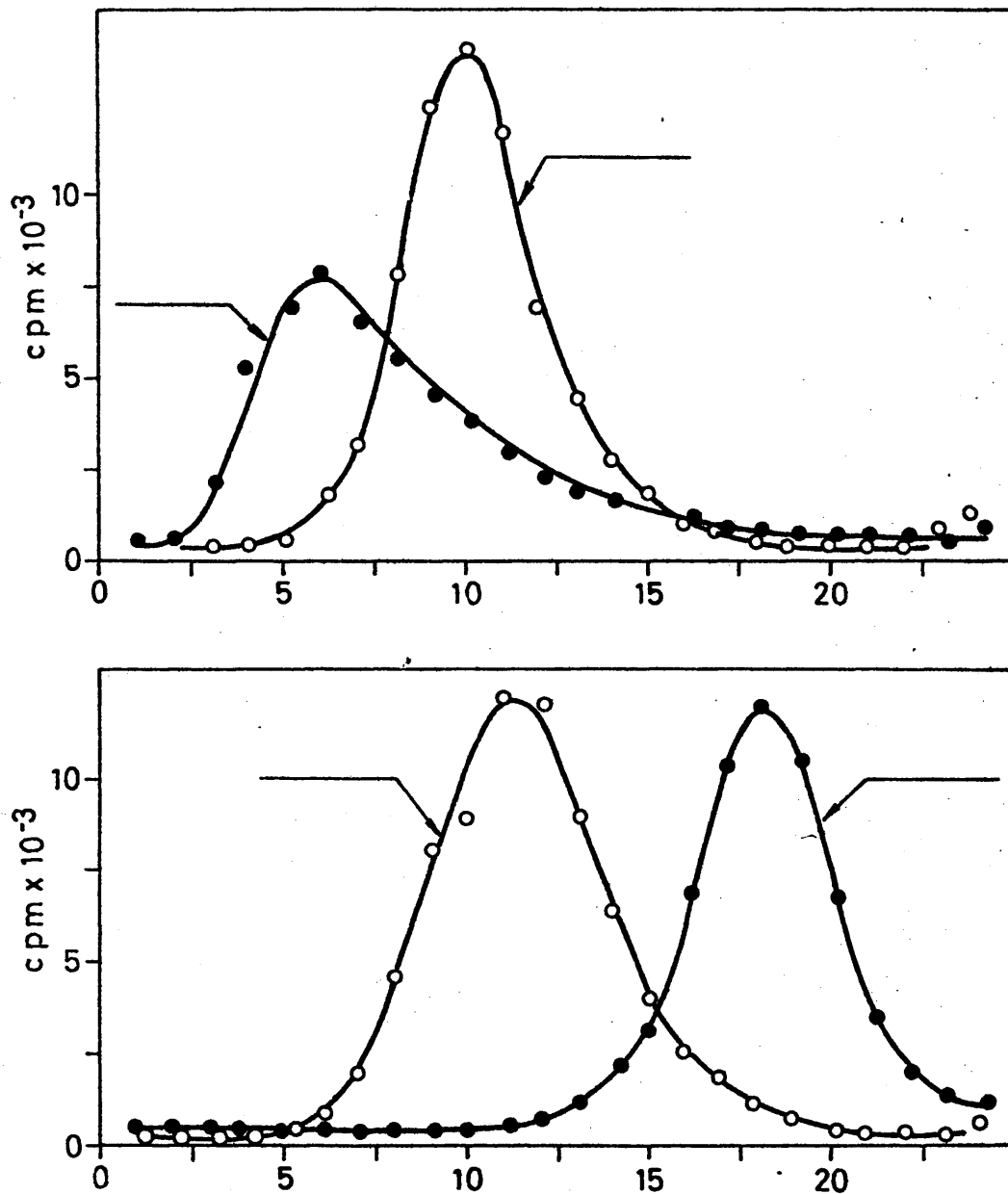


Figura 6

I.4.2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA FRACTURA MECANICA.

Otro punto a comentar, como hemos venido haciendo con los otros métodos degradativos utilizados en este trabajo, es ^{la} naturaleza del terminal producido durante la degradación mecánica. Poco o casi nada se conoce sobre cuales son los grupos liberados al producirse la fractura del biopolímero, por someter la solución a agitaciones a alta velocidad⁽²⁸⁸⁾. Parece probable que las fuerzas tangenciales que actúan sobre las macromoléculas producidas por las turbulencias originadas en el seno de la solución, pudieran ser suficientemente fuertes para romper enlaces covalentes⁽²⁸⁹⁾. Cálculos teóricos llevan a concluir que, dentro de una aproximación del cálculo, las fuerzas de tensión originadas son superiores a las necesarias para una desestabilización de enlaces que llevarían a ruptura internucleotídica⁽²⁹⁰⁾.

Experimentaciones realizadas⁽²⁸⁶⁾ llevan a la conclusión de que la degradación por U.S. (método de mecanismo paralelo al que venimos comentando), de soluciones de DNA producen aproximadamente un 90% de ruptura de enlace C-O y del orden del 10% de rupturas de enlaces P-O. La buena correlación entre los pesos moleculares estimados por datos de sedimentación y por determinación de grupos fosfatos terminales (suponiendo dos residuos fosfatos terminales por cada doble hélice de DNA) conduce a pensar, contrariamente a lo supuesto por Levinthal et. al⁽²⁸⁸⁾, que la rotura de C-C ocurre muy poco frecuentemente, si es que ocurre, por sonicación de DNA. La formación de terminales fosfatos procede de rupturas de enlaces C-O ó P-O, pero no de C-C, dando un terminal fosfato por cada ruptura⁽²⁸⁶⁾. No se observa la liberación de bases nitrogenadas durante la sedimentación⁽²⁹¹⁾, por análisis de materiales de peso molecular pequeño aislados de la solución. La sensibilidad de la detección per

mite decir que menos del 10% de roturas de DNA pueden ser acompañadas de eliminación de bases nitrogenadas (286).

Sin embargo, no ha sido determinado hasta que punto la ruptura de enlaces es nítida ni si existen zonas en la macromolécula donde pueden darse con mayor probabilidad.

Realmente, en nuestro estudio no hemos intentado dilucidar estos puntos ya que, como estas rupturas internucleotídicas conducen exclusivamente a la formación de nuevos extremos de cadenas, cualquiera que sean los grupos terminales a los que dé lugar, no se originarán nuevos puntos de iniciación de polimerización, cuando la muestra de DNA así degradada actúe frente a la DNA polimerasa, puesto que para que la polimerización tenga lugar es necesario, según hemos comentado en el apartado I.1., que el punto de enlace a la enzima sea interior en la cadena de DNA. En todo caso, si la fractura de la doble hélice diese lugar a la creación de grupos OH en posición 3' que, como vimos era requisito necesario para la unión con la enzima, la degradación de la muestra de DNA conduciría a la creación de nuevos puntos de unión con la enzima que no serían eficaces para la polimerización. Debido a las condiciones experimentales utilizadas no será necesario tener en cuenta este punto, ya que se actuó siempre en condiciones de exceso de proteína.

Por último, conviene comentar que este método degradativo no sólo no produce en el DNA nuevos sitios de unión a la DNA Polimerasa eficaces para la polimerización, sino que tampoco elimina los que se puedan haber creado por cualquier otro método en el DNA anteriormente al tratamiento. Esto equivale a afirmar que no es

probable que la fractura mecánica de la doble hélice se produzca en un punto próximo a una rotura simple convirtiéndola entonces en extremo de cadena. Una rotura simple en una de las cadenas del DNA parece ser un punto de gran flexibilidad en la macromolécula puesto que en esa zona se pierde la rigidez de la estructura doble hélice. No es probable por tanto, que sea una zona de máxima debilitación por las tensiones ocasionadas por las fuerzas tangenciales a que se encuentra sometida la doble hélice en el seno de la solución agitada a alta velocidad.

En nuestro estudio hemos supuesto, por haberlo considerado suficientemente fundamentado, que la fractura mecánica del DNA no disminuye el número de rupturas simples existentes en la doble hélice anteriormente al tratamiento. El buen acuerdo con los resultados obtenidos confirma nuestra suposición.

I.5. ASPECTOS CINETICOS DE LAS DEGRADACIONES.

De lo expuesto hasta aquí sobre los mecanismos de degradación de DNA que hemos estudiado: radiólisis, hidrólisis por tratamiento con DNasa, y agitación a alta velocidad de las soluciones, podemos resumir diciendo que los dos primeros métodos consiguen la degradación de una muestra de DNA por rotura de enlaces entre monómeros sobre una u otra cadena, mientras que el tercero dá lugar a la fractura directa de la doble hélice. Hay, por tanto, una clara diferencia cinética entre esos mecanismos, lo que nos va a permitir separarlos en dos grupos, considerando por un lado a la fractura mecánica y por otro las degradaciones producidas por agentes inductores de roturas simples.

En lo que respecta a la fractura mecánica por agitación de soluciones a alta velocidad, sus aspectos ciné

ticos serán estudiados en el capítulo IV.1, al presentar los resultados experimentales obtenidos en este trabajo. En cambio, estudiaremos en este capítulo la probabilidad de fractura de la doble hélice por coincidencia de dos roturas de enlace sobre cadenas distintas.

I.5.1. BASE ALEATORIA DE LA DEGRADACION.

En la mayor parte de los trabajos que han estudiado la radiólisis de DNA destacando los aspectos cinéticos de la degradación^(250,292-298), se supone, mas o menos implícitamente, que hay un proceso de tipo estadístico implicado en la serie de acontecimientos a través de los cuales se llega a la degradación de la muestra de DNA por la rotura de enlaces entre monómeros. Los datos que se pueden encontrar en la literatura a este respecto apoyan la hipótesis⁽²⁵⁰⁾ de que la fractura de la doble cadena producida por irradiación de la muestra se puede presentar al azar sobre los diferentes puntos de las moléculas y que el proceso de coincidencia de las roturas simples para producir la fractura es aleatorio⁽²⁹⁴⁻²⁹⁶⁾.

Análogas conclusiones se pueden hacer para la degradación con DNasa, con solo tener en cuenta el mecanismo de actuación de esta enzima para producir la degradación, ya que presenta un comportamiento cinético completamente identificable con el de cualquier otro método de gradativo que actúe sobre la macromolécula por producción de roturas simples debido a ataques locales del reactivo en puntos al azar de las cadenas⁽²⁷⁹⁾.

Por tanto, la existencia de los cuatro monómeros diferentes en las moléculas de DNA no va a introducir restricciones, al menos desde el punto de vista macromolecular, respecto a los puntos en los que sucede la fractura,

bien por causa de la irradiación o bien por la degradación enzimática.

I.5.2. PROBABILIDAD DE FRACTURA.

En el desarrollo de este trabajo utilizamos dos expresiones para el cálculo de la probabilidad de fractura de la doble hélice, recogidas de la literatura, basadas en el proceso estadístico comentado para la coincidencia de las rupturas de enlace internucleotídicos. Una de ellas, dada por Thomas⁽²⁷⁹⁾, y utilizada por Hagen^(297,298) y por Peacocke y Preston⁽²⁹⁶⁾, da la probabilidad de rotura doble en función de la probabilidad de rotura simple, teniendo en cuenta el incremento de la probabilidad de producción de la fractura como consecuencia de la desestabilización de la estructura bihelicoidal alrededor de una ruptura internucleotídica en un intervalo de h unidades monoméricas

$$P_{RD} = (2h + 1) P_{RS}^2 \quad (I.1)$$

En esta expresión P_{RD} representa la probabilidad de producción de rotura doble por unidad monomérica de la estructura doble hélice, el par de nucleótidos, y P_{RS} la probabilidad de rotura simple por unidad monomérica de cada cadena polinucleotídica. Esta expresión aunque fue aplicada inicialmente por Thomas a la degradación de DNA por DNasa, ha sido utilizada igualmente para la degradación radiolítica⁽²⁹⁶⁻²⁹⁸⁾, ya que puede ser aplicada a cualquier proceso de degradación de DNA que suceda a través de la producción de roturas simples distribuidas al azar a lo largo de las cadenas.

En la otra expresión utilizada, aunque deducida por Mingot⁽²⁵⁰⁾ a través de los datos obtenidos en la si

mulación numérica del proceso de degradación radiolítica del DNA, la probabilidad de obtención de rotura doble es independiente de la naturaleza del agente productor de roturas simples.

$$1 - P = e^{-(2h+1) N_p d_{RS}^2}$$

donde P representa la probabilidad de producción de rotura doble por molécula que contiene un número N_p de pares de nucleótidos y una densidad de roturas simples d_{RS} . Esta expresión de probabilidad ha sido deducida de datos de porcentajes de moléculas rotas obtenidos suponiendo, igualmente, que la fractura se produce por coincidencia, dentro del intervalo $(2h + 1)$, de roturas simples distribuídas al azar en la doble cadena.

Esta última expresión de probabilidad tiene la ventaja, utilizada en este trabajo, de que puede servir para el cálculo de la densidad de roturas simples a partir de los datos de fraccionamiento cromatográfico de una muestra polidispersa de DNA en los distintos tamaños moleculares.

I.5.3. INTERVALO DE DESESTABILIZACION DE UNA ROTURA SIMPLE.

Hemos visto que el parámetro h que aparece en las expresiones de probabilidad, dando cuenta del número de monómeros que pueden separar a dos roturas simples que aun conduzcan a rotura doble, afecta de tal manera que su incremento aumenta la probabilidad de rotura doble. El factor de amplificación de eficacia de producción de rotura doble, $2h + 1$, dá cuenta del incremento de probabilidad atribuible a la no ne

cesidad de coincidencia estricta de las roturas simples en cadenas antiparalelas.

Thomas⁽²⁷⁹⁾ determina el intervalo de desestabilización correspondiente a una rotura simple producida en el DNA por acción de la DNasa, suponiendo que los puntos de ataque de la DNasa están distribuidos al azar sobre la molécula, encontrando un valor de $h = 2$, lo que quiere decir una zona desestabilizada de dos pares de bases alrededor de la rotura simple.

Ha sido realizada una excelente revisión de los trabajos donde se calculen, o al menos se aportan datos para calcular, los valores para este parámetro cuando el agente degradante es la radiación gamma⁽²⁵⁰⁾. Recogemos de esa revisión una tabla donde aparecen resumidos los valores de h obtenibles de la literatura, dando la referencia de los trabajos de donde se obtienen los datos, ya que nos puede ser útil para comparar con los valores obtenidos por nosotros en el ajuste realizado en este trabajo.

TABLA 2

Valores de h determinados por:

<u>Enlaces de H rotos/rotura simple</u>		<u>P_{RD}/P_{RS}^2</u>	<u>Cálculo teórico</u>
6, 8	(299)	3 (298)	de 6 a 8 (302)
de 5 a 6	(265)	9 (297)	
10, 4	(300)	4 (296)	
4, 8 / 9, 5/24, 1	(301)		

(En función de la dosis)

En la tabla se ordenan los valores de h según las dos metodologías extremas utilizadas para su determinación.

Uno de los métodos utiliza los datos de número de enlaces de hidrógeno rotos y número de roturas simples producidas, determinados experimentalmente por métodos mas o menos directos, para, mediante su cociente, dar el número de nucleotidos que pueden separar a dos roturas simples que conduzcan a rotura doble^(265,299-301); como se comenta en la citada revisión⁽²⁵⁰⁾, este método es válido siempre que se suponga que no existe otra causa para la rotura de enlaces de hidrógeno que la desestabilización alrededor de la rotura simple. El otro método utiliza la relación (I.1) entre probabilidades de rotura doble y de rotura simple para, determinando los valores de número de roturas simples y de roturas dobles a partir de datos de viscosidad^(297,300), dispersión de luz⁽³⁰⁰⁾, o sedimentación⁽²⁹⁸⁾, y por cálculo según la metodología de Charlesby^(292,293), obtener valores para el parámetro h.

Observamos que los valores determinados para h coinciden solamente en el orden de magnitud. En el ajuste realizado con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo aportamos nuevos valores para el parámetro h que caen, como veremos en el capítulo de resultados, dentro del orden de magnitud de los valores recogidos de la literatura.

El parámetro h, al dar cuenta de la estabilidad de la doble hélice en la zona en que se ha producido una rotura de enlace, representa las magnitudes termodinámicas definitorias de la estabilidad de la estructura. Si el valor de h depende de la estabilidad de la molécula, cambios inducidos en esta estabilidad pueden modificar la probabilidad de rotura doble, así como diferencias en estabilidad que sean debidas a características composicionales o estructurales. Esta conclusión es extremadamente interesante para nosotros en el planteamiento

del cálculo de número de roturas simples que poseen cada una de las muestras de DNA que se utilizan como molde de la polimerización, como veremos, ya que según sea el agente degradante productor de roturas simples desestabilizará diferentemente la estructura alterando la estabilidad de un número distinto de enlaces de hidrógeno alrededor de la rotura simple, con lo que podremos hablar de una h, intervalo de desestabilización, característica según sea el agente degradante.

II. MODELO ESTADISTICO DE LA POLIMERIZACION DEL DNA.

En el estudio realizado sobre la cinética de polimerización para cada uno de las muestras de DNA estudiadas frente a la preparación de DNA Polimerasa utilizada, se encuentra, como detallaremos más adelante, que la cinética de polimerización puede venir dada por una expresión del tipo:

$$P = v_p \cdot t_p$$

donde P es la magnitud de la polimerización que viene medida por la cantidad de polímero sintetizado, en las condiciones experimentales fijadas, al utilizar como molde cada una de las muestras de DNA, v_p es la velocidad de polimerización dada como cantidad de monómeros incorporados al polímero durante la síntesis por unidad de tiempo, en las condiciones experimentales fijadas, y t_p es el tiempo durante el que se realiza la polimerización.

Debido a las características de funcionamiento descritas para la DNA Polimerasa utilizada, la velocidad de polimerización para cada muestra de DNA va a depender del número de puntos de iniciación para la polimerización que presente, que, según dijimos en el capítulo I.1, serán los extremos con grupo $(3')\text{-OH}$ que existan a lo largo de las moléculas del DNA estudiado, constituyendo roturas simples en el interior de las cadenas. Igualmente, la velocidad de polimerización dependerá de la concentración de cada uno de los monómeros necesarios para la síntesis del polímero, los desoxiribonucleosidos trifosfato de adenina, citosina, guanina y timina, que designaremos globalmente por $[d \text{ NTP}]$.

Según esto, la expresión que da la velocidad de

polimerización será del tipo:

$$v_p = k_v \cdot \left[N_{(3')\text{-OH}} (t_D, D, t \cdot v) \right] \cdot [d \text{ NTP}]$$

Dentro de la constante de velocidad, k_v , aparece incluida la influencia de la concentración de la enzima en la velocidad de polimerización, que, como estudiaremos más adelante, actúa incrementando proporcionalmente la velocidad. El ^{número} de extremos $(3')\text{-OH}$ que posee la muestra de DNA es función, en primera aproximación, del tiempo de tratamiento degradativo a que ha sido sometida para producirlos. Indicamos esta dependencia expresando $N_{(3')\text{-OH}}$ como función de esa variable en cada uno de los métodos degradativos utilizados en este trabajo: t_D , tiempo de tratamiento con DNasa; D , dosis comunicada al irradiar la muestra de DNA; y $t \cdot v$, tiempo y posición de velocidad en el tratamiento por agitación a alta velocidad.

El número de extremos $(3')\text{-OH}$ que tiene la muestra de DNA utilizada como molde y a la que se ha sometido a tratamiento previo de degradación, es realmente función del tiempo de polimerización, ya que ese número puede variar mientras dure la incubación con la enzima en presencia de los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfatos por dos razones: a) por perderse en forma de rotura doble al realizarse la polimerización y desplazar la rotura simple a lo largo de la cadena hasta encontrarse alguna otra rotura simple en la cadena molde, lo cual haría interrumpir la polimerización y fracturar la molécula en dos fragmentos, y b) por crearse a causa de la contaminación de enzimas hidrolíticas que pueda tener la preparación de DNA Polimerasa. Esta variación de $N_{(3')\text{-OH}} (t_D, D, t \cdot v)$ con el tiempo de polimerización será tanto mayor cuanto más fuerte sea el tratamiento previo de degradación que haya sufrido el DNA creando un número grande de extremos $(3')\text{-OH}$, y cuanto más largo sea el tiempo de polimerización.

Sin embargo, en una primera aproximación supondremos que el número de extremos $(3')\text{-OH}$ no varía durante el tiempo de polimerización. En el capítulo de Resultados presentaremos datos experimentales que justifican que la aproximación realizada es correcta dentro de los tiempos de polimerización utilizados en las pruebas standard.

El término $[dNTP]$ varía a lo largo del tiempo de polimerización. Esta variación es tanto mayor cuanto mas grande sea el ^{número} de extremos $(3')\text{-OH}$ existentes en la muestra de DNA. Sin embargo, si se actuase con valores de $[dNTP]$ iniciales suficientemente grandes para que las cantidades de ^{proximaleosido} ~~oxinucleosido~~ trifosfato consumidas fuesen despreciables frente a los valores iniciales, podríamos considerar, en una primera aproximación, que el término $[dNTP]$ permanece constante a lo largo de la polimerización. Lógicamente, esta suposición será tanto más válida cuanto mas corto sea el tiempo de polimerización.

En el capítulo de Resultados presentaremos el intervalo de validez de esta hipótesis justificando que en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, es posible su aplicación a lo que venimos comentando, dentro de una aproximación suficientemente buena para la mayoría de las muestras. Este término, por tanto, lo podemos incluir dentro de una constante.

De esta manera, la velocidad de polimerización puede venir expresada por:

$$v_p = k \left[N_{(3')\text{-OH}} (t_D, D, \text{punto } t \cdot v) \right]$$

donde k representa una constante de eficacia de la polimerización, en las condiciones experimentales fijadas, por punto de inicio y por unidad de tiempo.

Si, como hemos supuesto, el término $N(3')\text{OH}$ (t_D , D , $t \cdot v$) no se altera durante ~~el tiempo de~~ ^{la} polimerización, la velocidad no variará con el tiempo de polimerización. Como anteriormente hemos discutido, esto no es cierto más que para tiempos relativamente cortos y para muestras de DNA no muy degradadas, márgenes entre los que nos moveremos en las pruebas estándar de polimerización. En la presentación de los resultados experimentales obtenidos en este trabajo veremos que, a tiempos cortos, la velocidad es una constante, lo cual justifica las aproximaciones que hemos realizado. En cambio, a tiempos largos de polimerización, la velocidad varía con el tiempo.

Una vez explicitada de esta manera la velocidad, la expresión que da la polimerización obtenida quedará de la forma:

$$P = k t_p \left[N(3')\text{OH} (t_D, D, t \cdot v) \right]$$

donde la polimerización vendrá expresada en cantidad de nucleótidos polimerizados en las condiciones experimentales fijadas después de una incubación durante un tiempo t_p , de cada muestra de DNA con la preparación de DNA Polimerasa.

En las pruebas estándar de polimerización se utilizaron condiciones de saturación de la enzima, por lo que nos independizamos de la concentración enzimática, variable que, como dijimos, afecta a la constante de velocidad.

Como además, ^{en} los ensayos de polimerización se utiliza un tiempo fijo, (30 minutos), el término t_p puede ser incluido dentro de una constante, K , que englobe también a la que hemos llamado constante de eficacia de polimerización. De esta forma, la polimerización obtenida ve

drá expresada por:

$$P = K \cdot \left[N_{(3')\text{-OH}} (t_D, D, t.v) \right] \quad (\text{II.1})$$

Por tanto, en las condiciones de ensayo estándar, la Polimerización P depende sólo del n° de puntos de inicio (3')-OH originados en el DNA por los tratamientos degradantes previos.

La constante global, K, es una constante de eficacia de la polimerización en las condiciones experimentales fijadas para la prueba estándar en el DNA, durante el tiempo de incubación t_p . Vendrá expresada en picomoles de nucleótido incorporados en las condiciones fijadas de incubación, por picomol de punto de inicio. Va a englobar, por tanto, no solo la eficacia de la DNA Polimerasa de unirse al DNA, sino también la eficacia de polimerizar nucleótidos a partir del punto de unión al DNA, así como la eficacia para la detección del polímero sintetizado.

Es decir, representa el número de nucleótidos que, por término medio, se detecta que se incorporan a la fracción polímero por cada uno de los puntos de inicio, grupos (3')-OH, existentes en el DNA en las condiciones de ensayo utilizados. Somos conscientes de que la constante de eficacia global puede presentar algún tipo de dependencia respecto a la extensión de la degradación de la muestra de DNA utilizada como molde, bien porque la eficacia de detección del polímero sintetizado "de novo" quede influída por la degradación previa del DNA, bien porque lo que resulte afectado sea la eficacia de la DNA Polimerasa a unirse a DNAs diferentemente degradados, bien porque la longitud polimerizada, una vez unida la enzima a uno de los puntos de inicio del DNA, dependa de la

tes con el DNA durante el proceso de aislamiento.

b) Los extremos (3')-OH que se producen durante la degradación. Según dijimos, el único de los métodos de degradación utilizados que produce roturas simples con grupos (3')-OH es el tratamiento con DNasa, por lo que el número de extremos (3')-OH producidos se puede dar como función sólo del tiempo de incubación con DNasa.

c) Las roturas simples con grupo (3')-OH que desaparecen por producción de rotura doble bien por coincidencia, dentro del intervalo $2h + 1$, de dos roturas simples con grupos (3')-OH o bien por coincidencia de un extremo (3')-OH con otra rotura simple producida por cualquier otro método de degradación.

d) Las roturas simples con grupo (3')-OH libre que desaparecen al producirse una rotura simple en la misma cadena a una distancia no demasiado grande para que se produzca la desestabilización del fragmento de cadena existente entre esas dos roturas simples, separándose de la estructura doble hélice. La rotura simple es sustituida, entonces, por un fragmento corto de cadena sencilla que une dos estructuras bihelicoidales. El extremo (3')-OH es eliminado quedando un nuevo extremo 3' de cadena con un grupo terminal distinto, el originado en el ataque del radical radiolítico. Dentro de este término podríamos incluir también las alteraciones que puede experimentar el nucleótido terminal del extremo 3' de la rotura simple, así como cualquier otra alteración que impide la polimerización desde ese extremo por inutilizarlo para la asociación con la DNA Polimerasa y dirección de la incorporación de un nuevo nucleótido.

De una forma general, se puede expresar el número

ro de roturas simples con grupo (3')-OH de la siguiente manera

$$N_{(3')OH}(t_D, D, t_{..v}) = N_{(3')OH}^0 + N_{(3')OH}(t_D) - 2 N_{RD}^{(3')OH-(3')OH} - N_{RD}^{(3')OH-R} - N_P^{(3')OH} \quad (II.2)$$

donde:

$N_{(3')OH}^0$ representa el número de extremos (3')-OH iniciales consecuencia de la degradación sufrida por el DNA durante el aislamiento.

$N_{(3')OH}(t_D)$ representa el número de extremos (3')-OH producidos en la degradación enzimática del DNA.

$N_{RD}^{(3')OH-(3')OH}$ representa el número de fracturas producidas por coincidencia de dos extremos (3')-OH.

$N_{RD}^{(3')OH-R}$ representa el número de fracturas producidas por coincidencia de un extremo (3')-OH y una rotura simple producida por cualquier otro procedimiento de degradación.

$N_P^{(3')OH}$ representa el número de extremos (3')-OH aptos para la polimerización perdidos por cualquiera de las causas explicitadas en el apartado d) anterior.

Cada uno de los términos de la expresión (II.2) se puede explicitar en función de la densidad de roturas simples.

Así:

$$N_{(3')OH}^0 = N d_{(3')OH}^0$$

$$N_{(3')OH}(t_D) = Nd_{(3')OH}(t_D)$$

$$N_{RD}^{(3')OH-(3')OH} = N_P (2 h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}(t_D, D, t.v))^2 \quad (II.3)$$

$$N_{RD}^{(3')OH-R} = N_P (h_{(3')OH} + h_R + 1) (d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)) \cdot (d_R(t_D, D, t.v)) \quad (II.4)$$

$$N_P^{(3')OH} = N_P (h_{(3')OH} + h_R + 1) (d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)) (d_R(t_D, D, t.v)) + \alpha \cdot (d_R(t_D, D, t.v)) \quad (II.5)$$

donde N y N_P son, respectivamente, número de nucleótidos y número de pares de nucleótidos totales de la muestra, y $d_{(3')OH}^0$ es la densidad inicial de roturas simples con extremos $(3')\text{-OH}$ que posee la muestra anteriormente a cualquier tratamiento degradativo. α es el factor de proporcionalidad para dar la fracción de roturas simples radiolíticas que dan lugar a alteración del nucleótido terminal $5'$ de una rotura simple preexistente o a cualquier otra alteración que impide la polimerización desde el extremo.

Por $d_{(3')OH}(t_D)$ queremos indicar la densidad de extremos $(3')\text{-OH}$ producidos durante el tratamiento de degradación. Lo representamos en función del tiempo de tratamiento con DNasa porque, según comentamos ya anteriormente, este es el único tratamiento entre los que hemos utilizado que produzca extremos $(3')\text{-OH}$ al degra

dar al DNA.

En la expresión para el cálculo del número de fracturas producidas por coincidencia de dos roturas simples, tenemos en cuenta que tal como dijimos, no es necesario que esa coincidencia sea estricta, sino que mientras que las dos roturas simples estén separadas por un intervalo igual o menor que $2h + 1$, intervalo de desestabilización alrededor de una rotura simple, se producirá rotura doble. La probabilidad de producción de fractura vendrá, por tanto, corregida por el factor de amplificación $2h + 1$.

Igualmente, en el cálculo del número de fracturas producidas por coincidencia de un extremo $(3')\text{-OH}$ con otra rotura simple con cualquier otro grupo en el extremo (por ser, por ejemplo de origen radiolítico), habrá que tener también en cuenta la no necesidad de coincidencia estricta, y por tanto corregir la probabilidad mediante el factor $(h_{(3')\text{OH}} + h_R + 1)$, obtenido al utilizar un intervalo de desestabilización promedio entre los intervalos de desestabilización correspondientes a la aparición de un extremo $(3')\text{-OH}$ y a la producción de una rotura simple de origen radiolítico.

La fractura, en este caso, sucederá con una probabilidad que debe ser el producto de las probabilidades de que se produzcan cada rotura de enlace, la radiolítica y la enzimática corregidas por ese factor de amplificación de probabilidad de rotura doble.

Por $d_{(3')\text{OH}}(t_D, D, t.v)$ y $d_R(t_D, D, t.v)$ queremos expresar respectivamente, la densidad de roturas simples con extremos $(3')\text{-OH}$ y la de las que posean cualquier otro grupo extremo, que existen en el DNA después de someterlo a una incubación con DNasa durante un tiempo t_D , o a una irradiación hasta una dosis D , o a un tra

tamiento mecánico por agitación durante un tiempo t , a una posición de velocidad v . Estas densidades, por tan to, tienen en cuenta que algunos de los extremos $(3')\text{-OH}$ se habrán perdido como puntos de inicio eficaces para la polimerización por estar situados en los extremos de las cadenas al formar parte de una rotura doble. Podrían entonces venir expresadas como:

$$d_{(3')\text{OH}}(t_D, D, t.v) = d_{(3')\text{OH}}^0 + d_{(3')\text{OH}}(t_D) - d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-(3')\text{OH}} - d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-R} \quad (\text{II.6})$$

$$d_R(t_D, D, t.v) = d_R(D) - d_{\text{RD}}^{R-R} - d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-R} \quad (\text{II.7})$$

siendo $d_R(D)$ la densidad de roturas simples con cualquier otro grupo extremo, concretamente en nuestro caso, la densidad de roturas simples radiolítica, por lo cual la podemos representar en función de la dosis; y $d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-(3')\text{OH}}$, $d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-R}$ y d_{RD}^{R-R} las densidades de roturas dobles ocasionadas por coincidencia de dos extremos $(3')\text{-OH}$, un extremo $(3')\text{-OH}$ y una rotura simple radiolítica, y de dos roturas simples radiolíticas respectivamente. Las densidades de rotura doble $d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-(3')\text{OH}}$ y $d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-R}$ necesarias para el cálculo de las densidades de roturas simples con grupos $(3')\text{OH}$ y con cualquier otro grupo, vienen a su vez dadas por expresiones deducidas de las (II.3) y (II.4) dividiéndolas por N_p :

$$d_{\text{RD}}^{(3')\text{OH}-(3')\text{OH}} = (2 h_{(3')\text{OH}} + 1) (d_{(3')\text{OH}}(t_D, D, t.v))^2$$

$$d_{RD}^{(3')OH-R} = (h_{(3')OH} + h_R + 1) \left(d_{(3')OH}(t_D, D, t.v) \right) \cdot \left(d_R(t_D, D, t.v) \right)$$

La densidad de rotura doble d_{RD}^{R-R} viene dada por la expresión

$$d_{RD}^{R-R} = (2h_R + 1) (d_R(t_D, D, t.v))^2$$

con lo que al sustituir en (II.6) la expresión para $d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)$, queda:

$$\begin{aligned} d_{(3')OH}(t_D, D, t.v) &= d_{(3')OH}^0 + d_{(3')OH}(t_D) - \\ &- (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}(t_D, D, t.v))^2 - \\ &- (h_{(3')OH} + h_R + 1) \left(d_{(3')OH}(t_D, D, t.v) \right) \left(d_R(t_D, D, t.v) \right) \end{aligned}$$

que al ser una expresión cuadrática obliga a reagrupar términos para despejar en la ecuación de segundo grado,

$$\begin{aligned} &(2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}(t_D, D, t.v))^2 + \\ &+ \left[(h_{(3')OH} + h_R + 1) \cdot (d_R(t_D, D, t.v)) + 1 \right] (d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)) - \\ &- (d_{(3')OH}^0 + d_{(3')OH}(t_D)) = 0 \end{aligned}$$

donde la variable viene dada por:

$$\begin{aligned} d_{(3')OH}(t_D, D, t.v) &= - \frac{(h_{(3')OH} + h_R + 1) (d_R(t_D, D, t.v) + 1)}{2(2h_{(3')OH} + 1)} \pm \\ &\pm \frac{\sqrt{[(h_{(3')OH} + h_R + 1) (d_R(t_D, D, t.v) + 1)]^2}}{2(2h_{(3')OH} + 1)} + \end{aligned}$$

$$+ \frac{\sqrt{4(2h_{(3')OH}+1) \left[d_{(3')OH}^0 + d_{(3')OH}(t_D) \right]}}{2(2h_{(3')OH}+1)} \quad (II.8)$$

Igualmente podemos hacer para $d_R(t_D, D, t.v)$ sustituyendo en (II.7)

$$d_R(t_D, D, t.v) = d_R(D) - (2h_R+1) (d_R(t_D, D, t.v))^2 - \\ - (h_{(3')OH}+h_R+1) \left(d_{(3')OH}(t_D, D, t.v) \right) \left(d_R(t_D, D, t.v) \right)$$

de donde se deduce que

$$d_R(t_D, D, t.v) = - \frac{(h_{(3')OH}+h_R+1) \left[d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)+1 \right]}{2(2h_R+1)} + \\ + \frac{\sqrt{\left[h_{(3')OH}+h_R+1 \right] \left(d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)+1 \right)^2}}{2(2h_R+1)} + \\ + \frac{\sqrt{4(2h_R+1) d_R(D)}}{2(2h_R+1)} \quad (II.9)$$

La expresión (II.8) es demasiado compleja en su forma para poder deducir el tipo de variación que puede experimentar $d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)$ con cualquiera de las variables t_D , D , ó $t.v$, sobre todo teniendo en cuenta que el término $d_R(t_D, D, t.v)$ aparece solamente indicado en la expresión (II.8), teniéndose que deducir su valor a partir de la expresión (II.9), donde aparece explicitado en función de la dosis.

A una expresión mucho más simple y manejable para el cálculo de $d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)$ se llega si se simplifica dentro de las expresiones (II.6) y (II.7) cuando tienen en cuenta el número de extremos (3')-OH perdi

dos a causa de la formación de rotura doble.

Las densidades de roturas simples $d_{(3')OH}(t_D, D, t.v)$ y $d_R(t_D, D, t.v)$ obtenidas por las expresiones (II.6) y (II.7) respectivamente, están consideradas a su vez dentro del cálculo del número de roturas dobles en las expresiones (II.3) y (II.4). Por tanto, al eliminar los términos de densidad de rotura doble dentro de las expresiones (II.6) y (II.7), representaría eliminar términos de densidad al cuadrado frente a términos de densidad dentro de un término cuadrático. La simplificación consistirá, por consiguiente, en la eliminación de los términos de densidad de potencia superior a 2 en la expresión (II.2).

En la simplificación, las expresiones (II.3), (II.4) y (II.5) quedan sustituidas por las siguientes:

$$N_{RD}^{(3')OH-(3')OH} = N_P (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^0 + d_{(3')OH}(t_D))^2$$

$$N_{RD}^{(3')OH-R} = N_P (h_{(3')OH} + h_R + 1) (d_{(3')OH}^0 + d_{(3')OH}(t_D)) d_R(D)$$

$$N_P^{(3')OH} = N_P (h_{(3')OH} + h_R + 1) (d_{(3')OH}^0 + d_{(3')OH}(t_D)) d_R(D) + \alpha d_R(D)$$

Teniendo ya explicitados todos los términos de la expresión (II.2) en función de la densidad de rotu-

ras simples, podremos escribir, utilizando la relación obtenida entre polimerización y nº de grupos (3')-OH existentes como roturas simples en la muestra, (II.1), que la polimerización puede venir expresada como:

$$\begin{aligned}
 P = KN & \left[d_{(3')OH}^{\circ} + d_{(3')OH}(t_D) - \right. \\
 & - (2h_{(3')OH} + 1) \left[d_{(3')OH}^{\circ} + d_{(3')OH}(t_D) \right]^2 - \\
 & - (h_{(3')OH} + h_R + 1) \left[d_{(3')OH}^{\circ} + d_{(3')OH}(t_D) \right] d_R(D) - \\
 & \left. - \alpha d_R(D) \right] \quad (II.10)
 \end{aligned}$$

III. MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES.

Las operaciones que constituyen la parte experimental de este trabajo están orientadas a la detección del tipo de modificación de la capacidad como molde para la polimerización de muestras de DNA diferentemente alteradas cuando estas actúan frente a la DNA Polimerasa. Este hecho, y el que nos hayamos limitado en la observación al aspecto macromolecular exclusivamente, condicionan las operaciones realizadas.

Así, todas las operaciones llevadas a cabo y que comentaremos en este capítulo, están orientadas al aislamiento, caracterización, modificación y seguimiento de la alteración de las preparaciones de DNA, así como el aislamiento y caracterización de las preparaciones de la enzima utilizada en la detección de la capacidad molde, la DNA Polimerasa.

III.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PREPARACIONES DE DNA.

El hecho de que la composición y estructura del DNA estén claramente establecidas, y tengan carácter universal, condiciona el que el análisis de una preparación consista en la comprobación de que sus características se ajustan a una serie de datos típicos de la estructura propuesta.

Es de destacar que, aunque nuestro objetivo es el conocimiento de la estructura local de las discontinuidades intermonoméricas, hemos situado la observación a nivel de modificación de propiedades macromoleculares, lo que ha condicionado el uso de una metodología que permite seguir las variaciones en la heterogeneidad de la preparación.

ción, eximiéndonos del análisis químico detallado de las modificaciones a nivel nucleotido.

III.1.1. AISLAMIENTO DE DNA.

El haber elegido la observación de las modificaciones de las características macromoleculares condiciona, igualmente, los métodos de aislamiento de DNA elegidos, ya que imponen aquellos métodos en los que se altera lo menos posible la estructura, haciéndose deseable un alto grado de polimerización en la muestra obtenida.

En el aislamiento de DNA las operaciones necesarias para la eliminación de proteínas, ácidos ribonucleicos, etc., acarrearán una disminución muy importante de tamaño de la molécula original. Esto hace que normalmente se admita como buena una preparación cuyo peso molecular medio sea muy inferior al de la molécula en la célula, si al menos conserva la estructura doble helicoidal y el grado de polimerización no es demasiado bajo. Las caracterizaciones que se realizan sobre las preparaciones después del aislamiento nos indican el grado de bondad de la preparación obtenida haciendo especial referencia a sus características macromoleculares.

III.1.1.1. Material biológico de partida.

El DNA utilizado en este trabajo ha sido aislado de *Pseudomonas savastanoi* (CECT 93), a partir de células cultivadas en el laboratorio. Se eligió este material biológico de partida porque se conseguían de él preparaciones de DNA con un mayor grado de polimerización, condición que requeríamos al máximo para nuestro trabajo.

Los cultivos realizados se llevaron hasta la fase estacionaria de crecimiento en fermentador (10 litros) a fin de conseguir el mayor rendimiento posible. La pasta de células se procesó inmediatamente a su obtención por centrifugación continua del cultivo.

La composición del medio utilizado aparece en la Tabla 3. Las condiciones de cultivo han sido: 37°C, aireación con un caudal de 8 l/min. y agitación centrífuga a 200 rpm.

Excepcionalmente, y sólo para caracterizaciones de las preparaciones enzimáticas y ensayos rutinarios de las metodologías, se ha utilizado en este trabajo un DNA aislado de mamífero, el procedente de timo de térrera. El órgano, extraído del animal recién sacrificado, se congelaba inmediatamente con aire líquido para su traslado al laboratorio dónde se conservaba a -20°C hasta el momento de comenzar el proceso de aislamiento.

TABLA 3

MEDIO DE CULTIVO PARA P. SAVASTANOI.

COMPOSICION FINAL POR LITRO

KCl	1,5 g.	Na ₂ SO ₄	0,05 g.	Glucosa	1,0 g.
NH ₄ Cl	0,25 g.	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 g.	Acido ca	
NaCl	5,0 g.	CaCl ₂	2,0 mg.	samino	10,0 g. pH 7
K ₂ HPO ₄	6,1 g.	FeCl ₃	2,0 mg.		
KH ₂ PO ₄	3,0 g.	Glicerina	1,5 ml.		

La glucosa y el ácido casamino, se estilizaron por separado de la solución de sales.

III.1.1.2. Métodos de aislamiento de DNA.

Para el aislamiento de DNA de *P. savastanoi* hemos utilizado el método de Marmur⁽³⁰³⁾ y para el de DNA de timo de ternera el método de Kay⁽³⁰⁴⁾. Ambos métodos son clásicos para ambos tipos de materiales.

En lo que respecta al aislamiento de DNA bacteriano, los puntos más importantes a considerar son los siguientes:

La lisis de las células se realizó por tratamiento con lisozima, enzima que cataliza la hidrólisis del mucopéptido de la pared celular, seguido de la acción de un detergente; esta acción coordinada llevó, la mayoría de las veces, a una lisis total. En esta etapa se siguieron las indicaciones de Freyfelder⁽³⁰⁵⁾.

Se tuvo especial cuidado para lograr la inhibición de las nucleasas, cosa necesaria para obtener un peso molecular aceptable. Para ello se trabajó a bajas temperaturas, procurando que el tiempo transcurrido desde la lisis a la desnaturación de las proteínas fuese lo más corto posible y utilizando en las soluciones de lisis un detergente y un agente quelante de iones divalentes, especialmente Mg^{2+} , de los que las nucleasas tienen especial requerimiento.

La purificación se centró, fundamentalmente, en la eliminación de las proteínas y del RNA. Las primeras fueron eliminadas por desnaturación en la interfase formada en la emulsión fenol-agua. La desproteínización con fenol presenta ventaja respecto a la realizada con cloroformo isoamílico, ya que el número de tratamientos es menor, lo cual interesa desde el punto de vista de rendimiento.

El RNA fue eliminado por la acción de la ribonucleasa, que hidroliza al RNA liberando mononucleotidos pirimidínicos dializables, dejando una fracción no dializable que contiene la mayor parte de los nucleotidos púricos, por lo que el aislamiento finaliza con una precipitación selectiva del DNA con alcohol isopropílico.

El rendimiento obtenido de esta forma ha sido de 3 mg./g. de célula

III.1.1.3. Conservación y disolución de las muestras de DNA.

Normalmente hemos tratado de reducir al mínimo el número de precipitaciones y, por esta razón, los pequeños lotes de DNA, cuyo consumo iba a ser inmediato, se han conservado en solución. Cuando la conservación debía prolongarse el DNA se precipitaba con etanol, se lavaba con etanol absoluto y acetona y se desecaba a vacío, tras lo cual se conservaba por debajo de 0°C. La redisolución de este producto es lenta y al hacerla hemos tratado de evitar tratamientos mecánicos como homogeneización, agitación, etc., que pudieran dar lugar a degradaciones mecánicas. En general, el procedimiento ha sido dejar "hinchar" el producto en el solvente durante una noche y a continuación agitar muy suavemente hasta la total disolución; de ordinario se ha utilizado SS (0,15 M NaCl).

III.1.2. CARACTERIZACION DE LAS PREPARACIONES DE DNA.

III.1.2.1. Pureza del DNA.

Se pueden resumir en dos las impurezas que, da

do el método de aislamiento empleado, son más probables en las preparaciones de DNA: proteínas y RNA.

Se ha realizado sistemáticamente el control de estas impurezas en nuestras preparaciones por la valoración colorimétrica según el método de Lowry⁽³⁰⁶⁾, en el caso de proteínas, y por el método de Schmidt-Thannhauser⁽³⁰⁷⁾ en el caso del RNA.

Ambos métodos son fracamente adecuados para estos controles de pureza de una preparación de DNA aunque presentan el inconveniente de que una detección a nivel del 1% exige el consumo de cantidades de preparación del orden de 1 mg.

III.1.2.2. Determinación del contenido en 2-desoxirribosa.

Un control de la preparación de DNA consiste en la comprobación de que su composición responde a las características de la unidad monomérica del DNA previsible dentro del modelo Watson-Crick.

La comprobación de la relación equimolar entre base - desoxirribosa - fosfato, es posiblemente, la mejor comprobación de la ausencia en proporciones importantes de polinucleótidos distintos al DNA.

La determinación cuantitativa de desoxirribosa se realizó por el método de Dische⁽³⁰⁸⁾, según la modificación de Burton⁽³⁰⁹⁾, utilizando como patrón DNA o de soxiadenosina. En las condiciones de hidrolisis de este método solo se liberan los azúcares unidos a bases púricas, dada la diferencia de estabilidad del enlace N-glucosídico unido a una purina o a una pirimidina, lo cual

no es un inconveniente si se efectúa la corrección adecuada.

III.1.2.3. Determinación del contenido en fósforo.

La determinación del contenido en fósforos se realizó por el método de Griswoold⁽³¹⁰⁾, basado en el desarrollo de color que se produce en la reducción del anión complejo fosfomolibdato por el ácido 1-animo-2-hidroxinaftalen-4-sulfónico. La formación del complejo fosfomolibdato exige la mineralización previa, a ortofosfato, del fósforo presente en la muestra de DNA.

III.1.2.4. Determinación del coeficiente de extinción molar.

El coeficiente de extinción molar del DNA es un parámetro característico de su estado estructural, hasta el punto de que variaciones en su valor indican hasta que punto está desnaturalado.

En principio, un alto valor para este coeficiente podría indicar la presencia de RNA contaminante. Sin embargo, experiencias realizadas en el laboratorio demuestran que sólo contaminaciones de RNA superiores al 30% pueden interferir en el método, contaminaciones, por otra parte, fácilmente detectables por la técnica de Schmidt-Thannhausser.

La comprobación de la equimolaridad de azúcar y fosfato con la base se realizó por cálculo del coeficiente de extinción molar, referido a fósforo o desoxirribosa, del DNA. El conocimiento de la absorción de las muestras en las que después se analizaba fósfo

ro o desoxiribosa permite obtener el $\epsilon(p)$. Un valor de 6450 garantiza estar en presencia de una muestra que responde a las características estructurales fundamentales de la doble hélice que es el DNA.

III.1.2.5. Determinación de la relación de bases.

La determinación cromatográfica de la relación de bases de las muestras de DNA se realizó sobre capa fina de celulosa (MN 300) tras hidrólisis de las muestras en ácido fórmico concentrado durante 45 minutos a 175°C. Los dos solventes utilizados han sido: metanol-ácido clorhídrico concentrado-agua (70/20/10 V/V) y sulfato amónico (sol, saturada)-fosfato dipotásico 1M-isopropanol (77/20/3 V/V). La cuantización de las manchas se realizó por elución y espectrofotometría.

III.1.2.6. Curvas de transición térmica.

Las características de la transición conformacional inducida por calor de una muestra de DNA permiten conocer cual es su estructura y estabilidad, así como saber si existen modificaciones locales de la estructura doble helicoidal, siempre que éstas afecten a la cooperatividad, o estabilidad de la estructura.

Por otra parte, es bien conocido que la estabilidad de la estructura nativa del DNA está relacionada con la composición en bases de ese DNA debido a las diferentes posibilidades de formación de enlaces de hidrógeno de los pares de bases posibles y, también, a las diferentes interacciones de apilamiento en función de las bases.

El estudio de la transición se efectuó estudiando la variación de la absorbencia de una muestra en función de la temperatura, mediante el uso de un sistema de termostatación del compartimiento de cubetas de un espectrofotómetro UNICAM SP700, y midiendo la temperatura en el interior de la cubeta de muestra mediante la introducción en ella de la soldadura de un termopar calibrado.

En la siguiente tabla 4 se reúnen los datos de caracterización de las diferentes preparaciones de DNA que han sido utilizadas en este trabajo.

TABLA 4

	(P)	Abscia. 100°C	T _m	GC% (1)	%Prot	%RNA
		Abscia. 25°C				
P. Savastanoi 1	6825±120	1,36	95,8°C	66,5±1,7	1,0	
P. Savastanoi 2	6921±250	1,38	97,6°C		1,6	
P. Savastanoi 3	6923±180	1,37	96,2°C		1,2	
Timo de ternera 1	6420±100	1,40	86,0°C	43,5±0,7	1,8	1,0
Timo de ternera 2	6510±150	1,42	86,5°C		1,0	1,8
Timo de ternera 3	6480±130	1,41	86,7°C		1,6	1,4

(1) Datos promedio 12 hidrolizados y cromatografiados en capa fina. Corresponden a las preparaciones.

III.1.2.7. Cromatografía en DEAE-Celulosa.

Para poder seguir la degradación, por las diferentes metodologías utilizadas, de una muestra de DNA

se utilizó una técnica que proporciona información sobre la variación de la heterogeneidad de la población molecular que constituye en general una muestra de DNA. Esto se realizó mediante cromatografía en DEAE-celulosa.

La cromatografía centrífugada sobre pulpa de papel de DEAE-celulosa, ha sido descrita como un método que reúne la sensibilidad y reproductibilidad en el fraccionamiento de preparaciones de DNA en función de su peso molecular^(311,312), siendo también sensible a la desnaturación de la preparación, aunque no lo sea, como ha sido comprobado, a la existencia de roturas simples o pequeñas desnaturaciones locales.

Esta técnica permite observar la variación de los porcentajes de muestra de diferentes tamaños trabajando, sin embargo, con una muestra polidispersa; es decir, la observación de un material homogéneo dentro de una muestra heterogénea.

A parte de la necesidad de una técnica de este tipo para el trabajo que se ha realizado, una peculiar ventaja del método que lo hacía deseable ha sido que su sencillez y rapidez permite manejar gran número de muestras simultáneamente, paliando de esta manera lo extenso del trabajo a realizar.

La DEAE-celulosa que hemos utilizado es la Watman DE-81 tratada con NaOH 1M y lavada y equilibrada con tampón fosfato sörensen 0,01 M. La cromatografía se hace utilizando 0,5 g de DEAE-celulosa ya tratada. La carga se realiza con una solución de DNA que contiene entre 150 ug de DNA y 500 ug, cuando el seguimiento se realiza mediante espectrofotometría UV, o la cantidad necesaria para una buena detección cuando se utiliza DNA radiactivo.

La concentración iónica de la solución debe ser igual o inferior a $0,2 \text{ M Na}^+$ y el pH debe ser próximo a 7.

En las condiciones de carga descritas el DNA es retenido sobre la DEAE-celulosa; se pasan 10 ml. de cada uno de los eluyentes que aparecen en la tabla 5, acelerando su paso por centrifugación a aproximadamente $150 \times g$ y se recogen los eluidos, donde se determina la cantidad de DNA por espectrofotometría o conteo en centelleo según que el DNA sea o no marcado.

TABLA 5

Eluyente 1	0,01 M Fosfato (sörensen)	pH	7,0	
Eluyente 2	0,01 M Fosfato (sörensen)	pH	7,0	0,14 M NaCl
Eluyente 3	0,01 M Fosfato (sörensen)	pH	7,0	0,50 M NaCl
Eluyente 4	0,01 M Fosfato (sörensen)	pH	7,0	1,50 M NaCl
Eluyente 5	2,00 M NaCl, 0,2 M NH_4OH	pH	10,9	
Eluyente 6	2,00 M NaCl, 0,4 M NH_4OH	pH	11,1	
Eluyente 7	2,00 M NaCl, 1,0 M NH_4OH	pH	11,4	
Eluyente 8	1,00 M NaOH	pH	14,00	

El porcentaje de densidad óptica en cada uno de los eluidos representa el porcentaje en peso de muestra con un determinado grado de polimerización. La dispersión observada en la estimación de estos porcentajes es inferior al 10%, excepto cuando el porcentaje de la fracción es inferior al 5%, en cuyo caso la dispersión puede ser mayor.

Ha sido comprobado⁽²⁵⁰⁾ que la cromatografía que nos ocupa fracciona en función del peso molecular, desde el punto de vista semicuantitativo.

III.1.2.8. Determinación de la viscosidad intrínseca.

Las medidas de viscosidad se han realizado en un viscosímetro tipo Couette, el "low shear viscometer" de Beckman, que responde en todo a las características del modelo descrito por Zim y Crothers⁽³¹³⁾. El trabajar a concentraciones del orden de 10 ug/ml y a gradientes de velocidad de $0,4 \text{ sg}^{-1}$, nos ha permitido evitar las extrapolaciones por ser la viscosidad intrínseca en esta zona independiente de dichos parámetros experimentales.

Pese a la no dependencia aparente respecto a la concentración debido al hecho de trabajar en soluciones muy diluídas, hemos hecho una corrección por concentración de acuerdo con la expresión:

$$\frac{n_{sp}}{c} = (n) + k' (n^2) c \dots$$

utilizando como valor para la constante k' de Huggins 0,5, de acuerdo con lo que ha sido propuesto por Eigner et al.⁽³¹⁴⁾ y, también por Crothers y Zim⁽³¹⁵⁾. Salvo para los valores de viscosidad superiores a 100 dl/g, las correcciones han sido siempre inferiores al 3%.

El cálculo de pesos moleculares a partir de los datos de viscosidad se hizo por medio de las expresiones propuestas por Eigner y Doty⁽³¹⁶⁾. La utilización de estas expresiones ha requerido la realización de las medidas en SSC. Las expresiones son:

$$(n) = 1,01 \times 10^{-7} M^{1,32} \text{ hasta } 2 \text{ M Daltons}$$

$$(n) = 6,90 \times 10^{-4} M^{0,70} \text{ de } 2 \text{ a } 130 \text{ M Daltons}$$

III.1.2.9. Sedimentación en gradiente de sacarosa.

Las centrifugaciones en gradiente de sacarosa, se realizaron en una ultracentrífuga Spinco L2, y los gradientes se preformaron en un equipo formador de gra gradientes de concentración. La inclinación de los gra gradientes y la velocidad de centrifugación se varió en función de las características de las muestras que se analizaron.

Los detalles metodológicos se siguieron de van der Schans et al.⁽³¹⁷⁾. La detección se realizó en todos los casos por conteo en centelleo de las fracciones recolectadas tras la perforación inferior del tubo y su vaciado bajo presión controlada. alguna de las muestras se destinaba a refractometría a fin de determinar la pendiente del gradiente de concentración de sacarosa en función de la distancia al eje de giro.

Los coeficientes de sedimentación no se estima ron por la introducción de un DNA de referencia, sino por cálculo a partir de las tablas y expresiones al efec to propuestas por McEwen⁽³¹⁸⁾. Esta determinación de coe coeficientes de sedimentación no da valores absolutos, pero son coherentes internamente y, por tanto equivalentes, salvo un factor, a los determinados por ultracentrifugación analítica.

III.2. METODOS DE DEGRADACION DE DNA.

III.2.1. DEGRADACION POR IRRADIACION CON GAMMA.

Debido a que la irradiación del DNA se efectuó siempre en soluciones diluídas, y por tanto el efecto sobre el biopolímero sucede indirectamente a través de reacción con las especies radicales radioinducidas en

el agua, las características de la radiación ionizante utilizada no eran especialmente importante en este trabajo. Esto nos ha permitido escoger como radiación aquella cuya fuente nos era mas fácilmente accesible. Así pues hemos utilizado la unidad de irradiación NAYADE de la Sección de Isótopos de la Dirección de Química de la JEN.

La fuente de irradiación NAYADE, de tipo piscina está compuesta de 24 elementos activos de ^{60}Co con una actividad total de 10.000 Ci. La muestra se sitúa en el centro de una cápsula que baja hasta ajustarse en la geometría correspondiente en el fondo del pozo (circunferencia de elementos activos). La posibilidad de colocar las muestras a diferentes alturas dentro de la cápsula, la utilización de geometrías de distintos diámetros y diferentes números de elementos nos ha permitido irradiar a intensidades de dosis entre 2 y 50 Krads/min.

Las soluciones de DNA para irradiación se prepararon en todos los casos en SS (0,15 M NaCl). Los tubos de irradiación se lavaban previamente a su uso con mezcla crómica para evitar la presencia de materia orgánica extraña en la solución.

El control de las intensidades de dosis y de las dosis comunicadas se realizó por dosimetría Fricke⁽³¹⁹⁾, en las mismas condiciones en que se efectuaba la irradiación.

III.2.2. DEGRADACION POR TRATAMIENTO ENZIMATICO.

La degradación de las soluciones de DNA por tratamiento con DNasa se realizó en las condiciones descritas⁽³²⁰⁾, con algunas modificaciones que comentaremos.

Las soluciones de DNA para esta degradación se prepararon en todos los casos en SS. Para poder trabajar con una mayor sensibilidad a la hora de escoger el grado de degradación que se quería producir en el DNA por el tratamiento enzimático, sin que por ello nos llevara a la utilización de tiempos demasiado largos, se modificó la relación DNA/DNasa de la mezcla a incubar, previa una búsqueda de las mejores condiciones, utilizándose en todos los casos una relación de 10^4 . Se utilizó DNasa I (E.C. 3.1.4.5.) pancreática.

Se hicieron cinéticas incubando muestras independientes en diferentes tiempos, comprendidos entre cero y seis horas. Las muestras eran conservadas a -20°C para su estudio posterior.

III.2.3. DEGRADACION POR TRATAMIENTO MECANICO.

La degradación mecánica de las soluciones de DNA se realizó mediante utilización de un homogenizador de cuchillas a alta velocidad modelo VIRTIS "45", que puede trabajar hasta 45.000 rpm. Este aparato posee diferentes posiciones de selección de velocidad que han sido utilizadas para producir diferentes grados de degradación en las muestras de DNA. Para cada una de las velocidades seleccionadas se realizó cinética a diferentes tiempos oscilando entre 0 y 5 minutos, período en que se alcanza la degradación máxima para cada velocidad de agitación. Para poder expresar los puntos de la cinética conseguidos mediante este procedimiento se da como variable arbitraria el producto de la posición elegida para obtener cada velocidad por el tiempo de tratamiento realizado.

Las soluciones de DNA tratadas se prepararon en todos los casos en SS. Las muestras, una vez tratadas, se

conservaron a -20°C , para su estudio posterior. Para su conservación, cada muestra tratada se dividió en cuatro partes para su estudio por cromatografía, viscosidad, curva de transición y prueba de polimerización.

III.3. AISLAMIENTO DE DNA POLIMERASA.

Para estudiar la capacidad como molde de las muestras de DNA diferentemente degradadas, necesitábamos de una preparación de DNA Polimerasa altamente purificada, teniendo especial cuidado de que estuviese carente de DNA contaminante o de cualquiera de las DNasas, sobre todo de las endonucleasas, ya que la presencia de DNA interno en la preparación enzimática podría enmascarar los resultados en el ensayo de polimerización para las distintas muestras de DNA alteradas y la contaminación con nucleasas podría producir, durante la polimerización, la alteración simultánea de la muestra de DNA en estudio. Por estas razones nos decidimos a realizar el aislamiento de la enzima puesto que las pruebas realizadas con las preparaciones existentes en el mercado no resultaron satisfactorias a este respecto. En el aislamiento y purificación de la enzima se tuvo especial cuidado en atender a estos dos aspectos citados.

El aislamiento de la DNA Polimerasa se llevó a cabo a partir de pasta de células de E. coli B (CECT 101) obtenida por crecimiento en el laboratorio como a continuación se describe.

III.3.1. MATERIAL BIOLOGICO DE PARTIDA.

Uno de los problemas más importantes planteados en el aislamiento de una enzima es la enorme cantidad de células de partida necesarias para su extracción. Es-

to significa disponer de bastantes kilogramos de pasta de célula y por tanto de muchos litros de cultivo. Este problema se resolvió en el laboratorio por un proceso de cultivo casi continuo siguiendo un método⁽³²¹⁾ de producción de células bacterianas a gran escala y utilizando el medio que aparece descrito en la Tabla 6. La utilización de ese medio conjuntamente con fuertes aireaciones, permite llegar hasta concentraciones de células que dan una turbidez de 15 U.O./ml. medidos a 760 mu.

El llevar la producción de células por un proceso continuo, además de conseguir un mayor rendimiento en la obtención de grandes cantidades de células, garantiza que la recogida del material de partida para el aislamiento enzimático se hace siempre en la fase exponencial de crecimiento⁽³²¹⁾.

Las células bacterianas fueron extraídas del medio mediante centrifugación continua. La pasta de célula fué conservada a -20°C, hasta su posterior utilización, sin que esto produjera disminución de la actividad específica de la enzima aislada, como se comprobó en distintas porciones.

TABLA 6

Medio de cultivo continuo para E. coli B.
Composición final.

Cloruro magnésico	1,23 M	Acido bórico	0,005 M
Molibdato amónico	0,001 M	Acido clorhídrico	2,5 M
Sulfato ferroso	0,01 M	Fosfato monopotásico	3,33 M
Sulfato potásico	5,0 M	Citrato sódico	5,0 M
Sulfato amónico	17,5 M	Glicerina	8,0 g/l
Fosfato disódico			
Fosfato monosódico	tampón 0,2 M	pH 6,9	
Amoniaco	20,0 mM		

III.3.2. FRACCIONAMIENTO ENZIMATICO.

La DNA Polimerasa fué aislada a partir de células de *E. coli* siguiendo el procedimiento descrito por Jovin et al.⁽³²⁾ con modificaciones en alguna de las etapas, como comentaremos a continuación.

Para la obtención de extractos se realizó la li-sis celular mediante irradiación por ultrasonido. Tras estudio previo de las condiciones óptimas de lisis, se irradiaron porciones de 500 g. de pasta de célula suspendidas en 1 litro de tampón 0,05 M Tris HCl, 1mM EDTA pH 7,6, durante un tiempo de una hora en la que se conseguía la li-sis máxima en las condiciones de máxima potencia del apa-rato (potencia 100 watts). Para evitar su calentamiento durante la irradiación, la suspensión se sumergía en una mezcla frigorífica de hielo y sal, lo que permitía mante-ner la temperatura alrededor de los 4°C. Este método de lisis posee la ventaja de que durante ella se produce simultáneamente la degradación del DNA celular, lo cual facilita su separación de la fracción enzimática en las siguientes etapas del aislamiento. Se comprobó que la li-sis por sonicación de la suspensión de células en las condiciones realizadas no disminuía el rendimiento de activi-dad de la enzima aislada.

La etapa de precipitación con sulfato de estreptomicina fué realizada como aparece descrita por Jovin et al.^(31,32). Fué suprimida, sin embargo, la etapa de auto-li-sis del método citado, ya que al haber sido degradado el DNA interno durante la sonicación, en este momento del aislamiento aparecía como producto soluble en ácidos, ha-ciendo innecesaria la incubación de la preparación para su degradación por las nucleasas existentes en la prepara-ción. Esta simplificación permitió mejorar el rendimiento del aislamiento ya que durante la larga incubación se pro

ducía la pérdida de gran cantidad de proteínas.

La precipitación con sulfato amónico se realizó en las concentraciones descritas en el método⁽³²⁾, introduciendo modificaciones solo en cuanto al modo de precipitación, ya que esta se realizó por diálisis de la preparación enzimática en una solución de sulfato amónico, a concentración tal que se llegara a la concentración de precipitación en el momento de equilibrio de la diálisis. Consideramos mas conveniente este procedimiento ya que por producirse una variación mas suave del gradiente de concentraciones de sulfato amónico dentro de la preparación a lo largo del tiempo de precipitación, se consigue una precipitación mas selectiva de las proteínas para cada intervalo de concentración de sulfato amónico.

La etapa de purificación por DEAE-celulosa se realizó igualmente con modificaciones en cuanto al modo de operación, puesto que, debido a las cantidades y concentración de la preparación enzimática que llegaron a esta etapa de la purificación, resultaba mas cómodo la extracción de la fracción ácidos nucleicos por la DEAE-celulosa mediante la agitación de ella con la solución enzimática en matraz hasta el equilibrio, conseguido al cabo de unos pocos minutos.

Debido a la cantidad de pasta de partida (solo el 10% de la utilizada por Jovin et al.) la purificación no se pudo llevar mas allá de la etapa fosfoce-lulosa, puesto que la cantidad de proteína obtenida en esta última etapa era insuficiente para proseguir la purificación. Esta última etapa se realizó tal como la describen Jovin et al.

Para procesar todas las células, se fraccionó

la pasta de células obtenida en diferentes porciones que se purificaron paralelamente, procediendo a reunir algunas fracciones a medida que iba avanzando la purificación y las cantidades disminuían hasta llegar hasta una única fracción al entrar en la etapa de DEAE-celulosa.

Como la cantidad de fracción fosfocelulosa procedente de la última purificación realizada era insuficiente para cubrir todas las pruebas de control y búsqueda de condiciones óptimas de estudio y sobre todo, utilización como enzima para las pruebas de polimerización para todas las muestras de DNA alteradas, se utilizó la fracción DEAE-celulosa para el estudio de la capacidad molde de las muestras de DNA.

III.3.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Durante el aislamiento y de una manera sistemática, se realizó el control de la enzima en cada una de las diferentes etapas realizadas y en cada porción de la preparación utilizada.

El control de cada preparación comprendía el análisis de la cantidad de proteína (por el método clásico de Lowry⁽³⁰⁶⁾), la determinación de la actividad específica enzimática, según método descrito por Richardson et al.⁽³¹⁾, por la determinación de la cantidad de polímero sintetizado frente a un DNA "estándar"⁽²⁶⁾, y el análisis de la heterogeneidad proteínica por electroforesis en gel de poliacril-amida, en las condiciones dadas por Jovin et al.⁽³²²⁾. En la determinación de la actividad específica, el blanco se obtenía por adición de 0,2 ml. de 0,2 M pirofosfato tetrasódico para inhibir la polimerización⁽³²³⁾.

Presentamos tabulados (TABLA 7) los rendimientos obtenidos en cada una de las etapas del aislamiento de DNA Polimerasa.

TABLA 7

Etapa	Proteínas mg/ml	AE(*) Unid/mg	Actividad total(*)	Rendimiento	
				% prot.total	Activ.total
LISADO	25,0	3,3	16.500	100	100
ESTREPTOMICINA	15,0	14,0	7.500	20	50
SULFATO AMONICO	22,5	210,0	2.000	15,5	12,5
DEAE-CELULOSA	5,3	215,0	1.485	1,0	7,5
FOSFO-CELULOSA	1,3	210,0	660	0,6	4,0

Los datos presentados son valores promedios realizados entre todos los datos obtenidos para cada una de las porciones realizadas en el aislamiento.

(*) Los valores de actividad específica vienen dados en unidades Kornberg⁽³²⁾.

La preparación de DNA Polimerasa utilizada en este estudio, purificada hasta la etapa DEAE-celulosa, presentaba un cierto carácter nucleasico no requiriendo en Mg^{2+} , lo que nos hace pensar que esa actividad no es procedente de alguna endonucleasa contaminante sino que es debida a la actividad exonucleolítica que, como ha sido descrito, aparece asociada a la DNA Polimerasa de E. coli.

III.3.4. REQUERIMIENTOS DE LA DNA POLIMERASA.

Como puede observarse en los datos presentados en la Tabla 8, la preparación de DNA Polimerasa que hemos utilizado requiere la presencia de los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfato, de DNA y Mg^{2+} para su completa actividad.

La omisión de DNA en la incubación impide completamente la polimerización, a pesar de la presencia de los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfato, lo cual nos pone de manifiesto la ausencia de DNA contaminante en la preparación.

La omisión de uno, dos o tres de los nucleotidos disminuye la polimerización, no presentando preferencias aparentes en cuanto a los nucleotidos presentes.

Estas características de la preparación utilizada de DNA Polimerasa son análogas a las descritas para la enzima en la literatura y que ya hemos comentado en el capítulo I.1.

III.4. ENSAYO DE LAS MUESTRAS DE DNA FRENTE A LA DNA POLIMERASA.

III.4.1. POLIMERIZACION.

Cada una de las muestras de DNA alteradas por los diferentes métodos se sometió a la prueba de polimerización para ver su capacidad de actuación como molde frente a la preparación de DNA Polimerasa en la presencia de los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfato, precursores del polímero.

REQUERIMIENTOS DE LA DNA POLIMERASA

				pmol. dTTP- ³ H incorporados
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	dTTP- ³ H	100
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	dTTP- ³ H	160
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	- dGTP	210
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	dATP	454
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	dGTP	264
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	dATP	2140
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	dGTP	0
DNA Polimerasa	DNA	Mg ⁺⁺	dATP	0

La composición de la mezcla para este ensayo es similar a la descrita por Richardson et al.⁽³¹⁾, con una única diferencia en la composición del tampón utilizado, como aparece en la Tabla 9.

TABLA 9

Ensayo de actividad. Composición de la mezcla
para la incubación

Tampón Tris-HCl ph 8,0	40 mM
MgCl ₂	6,7 mM
DNA	100,0 ug/ml
dCTP	20,0 uM
dGTP	20,0 uM
dATP	20,0 uM
³ H-dTTP	20,0 uM , 0,1 Ci/mM
DNA Polimerasa	0,10-0,70 unidades enzimáticas/ml

Volumen de la mezcla para la incubación: 0,50 ml.

Las muestras se incuban a 37°C, durante 30 minutos en el caso de la prueba estándar para las diferentes muestras de DNA alterado o durante tiempos diferentes en el caso de realización de cinéticas de polimerización. La detención de la polimerización se realiza enfriando en hielo o por adición de 0,5 ml. de ácido perclórico (PCA) 1N en frío, según el método de detección utilizado.

En los ensayos de actividad como molde de las muestras de DNA alteradas se utilizaron condiciones de exceso de enzima.

III.4.2. DETECCION DE LA POLIMERIZACION.

La detección de la cantidad e polímero sintetizado durante el ensayo de actividad se realiza midiendo la cantidad de radioactividad incorporada como fracción polímero. Esto requiere la separación previa de la radioactividad existente en la solución incubada en forma de nucleosido trifosfato de la timina.

Existen diferentes métodos de detección que realizan esta separación. En este trabajo se ha utilizado predominantemente un método desarrollado por nosotros para conseguir mayor sensibilidad y disminuir la contaminación de los blancos, utilizando una modificación de la técnica de cromatografía centrífugada en DEAE-celulosa^(250,311,312). Para la comprobación de la bondad de ese método se realizaron estudios paralelos con otros dos métodos reconocidos y aceptados: el método del disco de papel de filtro descrito por Bollun⁽³²⁴⁾, y el del disco de papel de fibra de vidrio descrito por Richardson⁽³²⁰⁾.

III.4.2.1. Comparación de los métodos.

A. Influencia de la cantidad de proteínas.

Una de las dificultades que presentan los métodos de detección por filtración y fijación sobre disco es la lentitud de la filtración del precipitado cuando existen cantidades altas de proteínas.

Esta dificultad no se presenta en la detección por el método de cromatografía, que, como puede verse en los resultados presentados en la tabla 10, no aparece alterado por la presencia de cantidades variables de proteínas, al menos hasta una relación DNA/proteína

de 10^{-1} . Se ha comprobado, igualmente, que la presencia de cantidades variables de proteínas, dentro de los márgenes citados, no altera la elución de la cromatografía.

En cambio, para el método del disco se puede observar gran dispersión entre los duplicados y un cambio brusco de la eficiencia del método por la presencia de cantidades crecientes de proteínas.

TABLA 10

Muestras	DNA- ³ H	albumina μg	Método del disco cpm	Método de cromatografía cpm
A	37,6 μg, 2,6.10 ⁵ dpm	0	252,00 279,64	23,06 23,47
B	"	100	40,81 80,20	23,97 23,18
C	"	200	78,27 80,34	23,08 23,45
D	"	300	76,77 46,93	24,02 23,89

B. Fondos.

Otra dificultad existente cuando la detección se realiza por el método del disco es la contaminación de éste cuando la actividad específica de la fracción ácido soluble es alta, ya que resulta difícil la eliminación completa de la actividad soluble del precipitado.

Como puede verse en los datos presentados en la tabla 11, esta dificultad no existe en el caso de detección de la actividad por cromatografía; puede verse que la fracción polímero (fracción 8) no presenta actividad contaminante.

TABLA 11

	0 μ Ci	0,05 μ Ci	0,5 μ Ci	1,0 μ Ci	2,0 μ Ci	3,0 μ Ci	4,0 μ Ci	5,0 μ Ci
NR	50 50	1.000 900	7.400 6.900	15.000 16.800	28.512 29.201	48.401 49.109	54.506 55.209	69.806 68.120
LAV 1	40 50	250 300	5.400 5.600	11.540 10.500	22.200 22.020	27.810 27.140	35.600 40.720	46.020 48.930
LAV 2	60 50	140 130	400 500	600 540	709 610	1.406 2.126	1.710 2.100	2.301 1.614
LAV 3	50 40	120 130	360 250	320 310	315 320	300 310	308 315	400 296
LAV 4	50 60	60 60	120 110	130 100	115 109	110 102	100 90	100 86
LAV 5	60 50	70 60	50 50	80 59	80 70	50 40	50 50	50 56
TOTAL		1.400	13.500	27.800	52.700	78.900	108.100	127.300
Eluyente 8	70 82	70 91	78 80	90 85	72 80	69 70	74 60	78 82

TABLA 11 (Continuación)

Los datos que aparecen en la tabla están expresados en cpm. En la columna de DEAE-celulosa fue fijada 0,5 ml de la mezcla constituida por Tampon Tris-HCl pH 8,0 y 40 mM, $MgCl_2$ 6,7 mM, 100 $\mu g/ml$ de DNA no radiactivo, 10 $\mu g/ml$ preparación de DNA Polimerasa, dGTP 20 μM , dATP 20 μM , dCTP 20 μM y dTTP- 3H 20 μM con actividad variable de 0, 0.05, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 μCi . Esta mezcla no fué incubada, impidiéndose la polimerización por adición inmediata de 10 ml de eluyente 2. En la tabla aparecen los valores correspondientes al conteo de 2 ml. de la fracción no retenida en la columna y a cada uno de los cinco lavados realizados con eluyente 2, así como el conteo de la fracción eluida con eluyente 8.

El disco, en cambio, presenta valores de contaminación creciente con la radiactividad de la fracción soluble que pasa a través de él, como puede verse en los datos presentados en la tabla 12

TABLA 12

<u>0μCi</u>	<u>0,05μCi</u>	<u>0,5μCi</u>	<u>1,0μCi</u>	<u>2,0μCi</u>	<u>3,0μCi</u>	<u>4,0μCi</u>	<u>5,0μCi</u>
60	124	227	377	644	905	769	1832
74	126	194	393	629	909	759	1847
68	121	194	383	639	919	774	1852
56	124	236	398	624	924	754	1837
64 ± 9	124 \pm 2	212 ± 19	388 ± 19	634 ± 10	914 \pm 8	764 \pm 9	1832 ± 8

Los datos que aparecen en la tabla están expresados en cpm. Se utilizó discos de papel de fibra de vidrio

TABLA 12 (Continuación)

Whatman FG/C. A través de ellos se filtró el precipitado en PCA 5% de la mezcla constituida por: tampon Tris-HCl pH 8,0 y 40 mM, $MgCl_2$ 6,7 mM, 100 $\mu g/ml$ de DNA no radiactivo, 10 $\mu g/ml$ de preparación de DNA Polimerasa, dGTP 20 μM , dATP 20 μM , dCTP 20 μM y dTTP- 3H 20 μM con actividad variable de 0, 0.05, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 5.0 μCi . La mezcla no fué incubada, precipitándose inmediatamente con PCA. Los discos fueron lavados siguiendo el método descrito por Richardson⁽³²⁰⁾.

C. Dispersion.

Como puede verse en la tabla 13, la dispersión que presenta el método de cromatografía es bastante baja (el 10%), muy aceptable cuando se la compara con la obtenida en el método del disco, en las condiciones experimentales usuales.

TABLA 13

<u>Método Cromatografía</u>	<u>Método Disco</u>
8.843	36.427
9.003	27.418
8.890	46.889
8.880	28.516
8.798	45.316
8.970	31.524
8.967	42.331
<hr/>	
8.908±88	36.911±7.957
10%	22%

Los datos están expresados en cpm.

III.4.2.2. Método de cromatografía.

Para la detección por cromatografía en DEAE-celulosa se utiliza el hecho de que los nucleótidos disueltos en tampón fosfato 0,01, pH 7,0, y 0,14 M ClNa, no se fijan a la DEAE-celulosa y si en cambio los polinucleótidos e incluso aquellos oligonucleótidos suficientemente largos. Por tanto, la separación de la radioactividad existente como polinucleótido se consigue fácilmente con solo pasar la solución a través de un lecho de DEAE-celulosa y eluir con una solución que tenga esa composición dada (eluyente 2, Tabla 5). Lavando suficiente número de veces con ese eluyente (basta con cinco lavados) se arrastra toda la fracción ácido soluble sin que en cambio sea eluido el polímero. La fracción polímero es recuperada totalmente al eluir con 1M NaOH (eluyente 8, Tabla 5).

Para un lecho de DEAE-celulosa realizado con 0,5 g. de pasta seca y empapada en agua, los volúmenes de eluyentes utilizados son de 10 ml. para cada uno de los lavados, con eluyente 2 y de 3 ml. para el eluyente 8. A fin de conseguir una completa recuperación del polímero radiactivo fijado se realiza tres lavados sucesivos, cada uno con 3 ml. del eluyente 8.

El conteo de la radiactividad recuperada se realizó en un espectrómetro de centelleo líquido (Nuclear Chicago). La composición del medio de centelleo líquido aparece en la Tabla 14. En estas condiciones, el método tiene una eficiencia del 3,70% para el eluyente 8 y del 4,65% para el eluyente 2.

TABLA 14

Composición del medio de centelleo para
contaje en la detección por el método de
cromatografía

PPO	7 g /l.	POPOP	0,25 g/l.
Naftaleno	60 g /l.	ETOH	150 ml/l.
Etilenglicol	250 ml/l	Dioxano	600 ml/l

III.5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

En realidad, la verdadera variable del proceso que estamos estudiando es la densidad de roturas simples d_{RS} que existe en las moléculas de DNA. Por tanto, lo más conveniente hubiera sido determinar directamente la d_{RS} de las muestras de DNA utilizadas como molde en ca da caso para poder comprobar la correlación propuesta entre d_{RS} y polimerización. Sin embargo, durante el tiempo de realización experimental de este trabajo no disponíamos de ningún método de determinación directa de d_{RS} , por lo que acudimos a procedimientos indirectos de cálculo.

Presentamos a continuación los dos tipos de co rrelación de esta variable que han sido utilizados para el cálculo, por un lado con la probabilidad de rotu ra doble por molécula, medida a través de un sistema de fraccionamiento cromatográfico, y por otro con el tiempo de tratamiento degradativo a que haya sido so- metida la muestra de DNA.

III.5.1. CALCULO DE d_{RS} A PARTIR DE LOS DATOS DE FRACCIONAMIENTO CROMATOGRAFICO.

De la expresión de probabilidad de rotura doble por molécula, ya comentada en el capítulo I.5, puede derivarse una expresión para d_{RS} de la forma:

$$d_{RS} = \sqrt{\frac{-\ln (1 - P_{RD})}{(2h + 1) N_P}}$$

que permite calcular los valores de d_{RS} de la muestra, siempre que se disponga de un método experimental que permita determinar la P_{RD} para un determinado número de pares.

Como la probabilidad de rotura doble representa la fracción de moléculas rotas para cada d_{RS} , su complemento a 1 será la fracción de moléculas, de peso molecular comprendido dentro de un intervalo determinado, que sobreviven al tratamiento degradativo aplicado sobre la muestra para producirle una determinada d_{RS} .

$$1 - P_{RD} = \frac{C}{C_0}$$

La técnica de fraccionamiento por cromatografía en DEAE-celulosa, ya descrita, permite seguir las variaciones de la polidispersidad de una muestra de DNA según la degradación a que haya sido sometida, ya que permite medir el porcentaje de moléculas no rotas que existen para cada intervalo de peso molecular considerado. La utilización, por tanto, de esta metodología permite medir $\frac{C}{C_0}$ y, con ello, calcular la d_{RS} a través de la expresión, resumen de las anteriores:

$$d_{RS} = \sqrt{\frac{-\ln \left(\frac{C}{C_0} \right)}{(2h + 1) N_p}} \quad (\text{III.1})$$

Los porcentajes experimentales obtenidos en el fraccionamiento en DEAE-celulosa debería ser sometidos a una corrección que tenga cuenta de que la probabilidad de rotura doble es la misma en cualquier punto de una molécula y de que puede darse el paso directo desde moléculas de muy alto peso molecular a moléculas de peso molecular mas pequeño, cuando se hace la observación en una determinada fracción de la degradación que le ha dado lugar, sobreestimándose la probabilidad de esa degradación⁽²⁵⁰⁾.

De acuerdo con la discusión que hace Mingot sobre esta corrección⁽²⁵⁰⁾, no la hemos realizado sobre nuestros datos experimentales puesto que el valor que calcula es considerablemente inferior a los errores que llevan consigo las determinaciones experimentales. Además, nuestros resultados experimentales confirman que la corrección apenas los afectaría. En la figura 7 se puede ver que la fracción VI no se modifica durante la destrucción de la VIII y que la VII empieza a disminuir prácticamente cuando la VIII termina de degradarse. No se aprecia, por tanto, paso directo de fracción VIII a fracciones de peso molecular inferior al valor límite de la VII, haciendo innecesaria la corrección también en nuestros datos experimentales.

De la deducción de la expresión de probabilidad de rotura doble que venimos utilizando⁽²⁵⁰⁾ se puede concluir que:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-(2h+1) N_p (d_{RS} + d_{RS}^0)^2} \quad (\text{III.2})$$

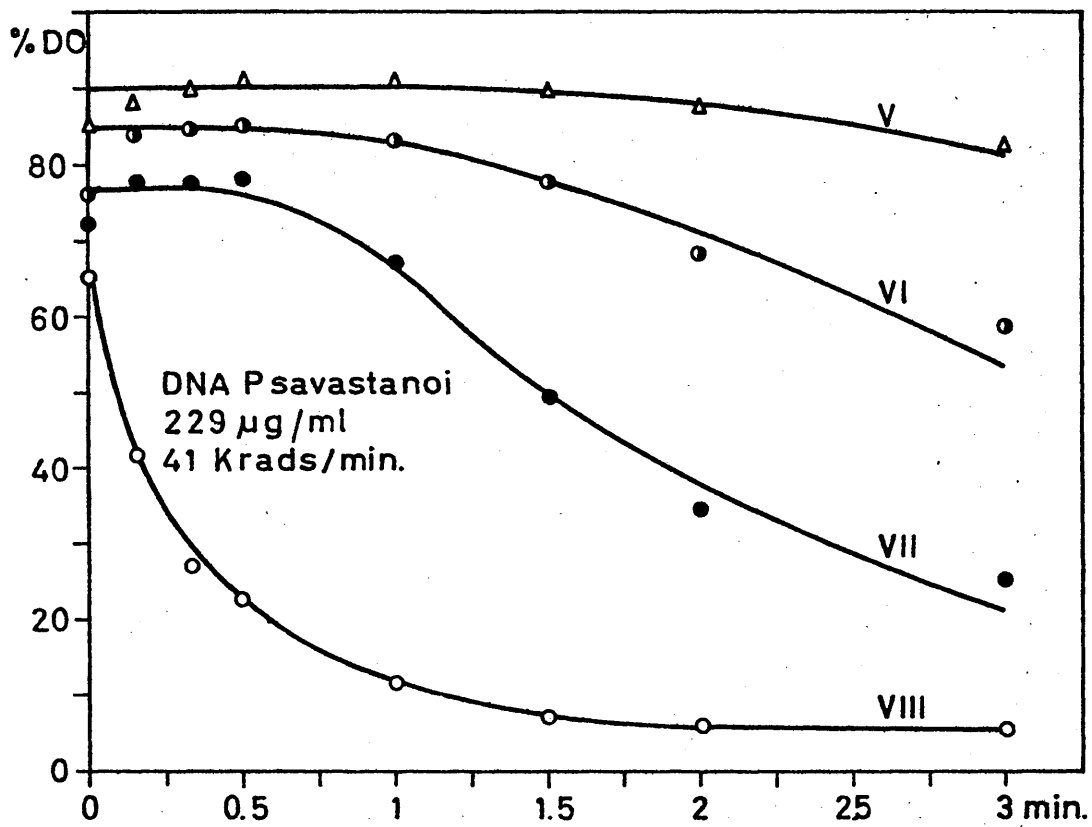


Figura 7

Esta expresión indica que C_0 es la concentración de moléculas de peso molecular comprendido dentro de un intervalo determinado existentes antes de producirse ninguna degradación. Teniendo esto en cuenta, el porcentaje de moléculas supervivientes de una determinada fracción cromatográfica, $\frac{C}{C_0}$, es el porcentaje absoluto de esa fracción de la muestra, sin que haya que referirlo al porcentaje de la fracción en la muestra correspondiente al tiempo cero de degradación.

A la concentración que se tenga en el tiempo cero de tratamiento degradativo la designaremos como concentración inicial C_i , y vendrá expresada como el porcentaje de la fracción de que se trate en el instante inicial del tratamiento, verificándose para ella

$$C_i = e^{-(2h+1) N_p (d_{RS}^0)^2} \quad (\text{III.3})$$

Sin embargo, para que todo lo que venimos diciendo sea correcto, es necesario suponer que toda la degradación que haya sufrido la muestra de DNA anteriormente al comienzo de la degradación utilizada para alterar al DNA, haya sucedido a través de la producción de roturas simples.

Si se cumple esta hipótesis, -lo cual es equivalente a afirmar que no hubo degradación mecánica importante durante el aislamiento, ya que no hemos realizado experiencias cruzadas de degradación en que previamente a una degradación vía roturas simples se realizase una degradación mecánica-, la muestra debe responder en el tiempo cero de degradación a una distribución de tamaños como lo que sería de esperar según la dependencia ya comentada entre probabilidad de rotura doble y peso molecular. Cada una de las fracciones de la mues-

tra debe cumplir, por tanto, la expresión, deducida de la (III.3):

$$d_{RS}^{\circ} = \sqrt{\frac{-\ln C_i}{(2h + 1) N_p}} \quad (III.4)$$

En la Tabla 15 se muestran los valores de los errores relativos entre los valores de d_{RS}° calculados a partir de los datos de fracción de moléculas de tamaño igual o superior a los correspondientes a cada una de las fracciones V, VI, VII y VIII, en los diferentes lotes de DNA de *P. savastanoi* que hemos utilizado en las experiencias correspondientes a este trabajo. La primera columna de cada grupo muestra los errores relativos calculados empleando para obtener las d_{RS}° valores de N_p resultado de tomar como peso molecular de cada una de las fracciones utilizadas, que aparecen encabezando cada columna, los valores de peso molecular medio en peso estimados experimentalmente⁽²⁵⁰⁾; la segunda columna de cada grupo muestra esos mismos datos de error cuando en el cálculo de d_{RS}° se utilizan valores de N_p deducidos de otros pesos moleculares para las fracciones que se encuentran dentro del margen de error con que fueron determinados los pesos moleculares medios^(*).

Las dispersiones que se obtiene en el primer caso cuando además no se utilizan los datos de fracción 5, (grupo central de la tabla 15), son del mismo orden que los que afectan a la totalidad de la experimentación. En

(*) Posteriormente a la redacción de este trabajo han sido corregidos los valores de peso molecular medio en peso estimados experimentalmente en el laboratorio de Biofísica de la JEN, acercándose más a los presentados en la segunda columna de cada grupo⁽³²⁵⁾.

TABLA 15

Error relativo de d_{RS}^0 estimada por cromatografía

F8/F7/F6/F5	F8/F7/F6/F5	F8/F7/F6	F8/F7/F6	F7/F6/F5	F7/F6/F5
50/20/10/3	43/17/9/4	50/20/10	43/17/9	20/10/3	17/ 9/ 4
27,76	20,67	13,95	16,24	22,87	12,85
28,60	21,04	12,17	15,30	23,96	13,05
26,13	14,14	12,57	10,36	23,21	9,95
29,28	17,57	14,36	11,62	25,18	14,13
24,30	12,80	11,49	8,23	27,21	14,79
24,30	12,80	11,49	8,23	27,21	14,79
19,58	11,69	11,62	11,47	22,76	11,47
24,30	12,80	11,49	8,23	27,21	14,79
30,89	23,86	12,50	12,50	29,36	22,44
25,86	15,20	8,23	6,84	27,03	16,29
23,98	13,61	8,23	4,22	25,18	15,14
22,64	10,89	9,21	6,84	25,18	12,57
13,48	8,27	7,44	9,44	14,07	9,44
17,77	8,12	5,35	8,23	20,20	8,23
23,53	13,56	14,06	11,62	27,21	14,79
42,42	28,32	27,74	21,69	37,54	18,86
37,30	25,30	21,68	18,03	28,77	20,25
17,01	0,05	1,96	0,05	17,15	0,05
32,14	23,03	21,69	23,19	23,21	6,94

Los valores que aparecen en la cabeza de cada columna corresponden a los de los pesos moleculares de las fracciones 8, 7, 6 y 5 utilizados en cada uno de los casos. Los valores que se representan son los porcentajes de error entre los valores de $d_{(3')-OH}^0$ correspondientes calculados a partir de cada una de las fracciones que aparecen en cabeza de columna, para cada una de las preparaciones de DNA utilizadas en las experiencias del presente trabajo.

el segundo caso, se rebajan estas dispersiones en todos los grupos, indicando que dentro del margen de error de los pesos moleculares de las fracciones, se obtiene un buen ajuste de los datos experimentales a la expresión

$$\sqrt{\frac{-\ln C_i}{(2h + 1) N_p}} = \text{cte.}$$

para los N_p de cada una de las fracciones, lo que prueba, dentro de las aproximaciones realizadas, que la distribución de tamaños de nuestras preparaciones antes de haber sido sometidas a cualquier degradación, está de acuerdo con la que se obtendría por un proceso de degradación vía roturas simples, por lo que damos como bueno este método de cálculo de d_{RS} a través de los datos cromatográficos.

La ventaja de tener en cuenta la densidad de roturas simples inicial de la muestra es que permite independizarse del grado de polimerización de la preparación obtenida en el aislamiento para todos los cálculos.

En nuestros cálculos y expresiones hemos supuesto, además, que esas roturas simples iniciales de la muestra de DNA son debidas exclusivamente a hidrolisis enzimática de los enlaces entre los eslabones de las cadenas polinucleotídicas producidas durante las etapas del aislamiento a causa de la coexistencia con el DNA durante un determinado período de las enzimas hidrolíticas procedentes del lisado celular. En consecuencia, suponemos que todas las roturas simples iniciales de la muestra poseen grupos (3')-OH libres. Esta suposición no está en contradicción con lo descrito en la literatura sobre aislamiento de DNA de microorganismos.

Hay que hacer la consideración de que, como la expresión (III.1) tiene en cuenta la d_{RS} que debe existir en la muestra de DNA para que solo quede una fracción $\frac{C}{C_0}$ de las moléculas de peso molecular comprendido dentro de un intervalo determinado, la densidad allí expresada incluye tanto las roturas simples producidas durante el tratamiento degradativo como las iniciales, preexistentes en la muestra. Es decir, se puede escribir:

$$\sqrt{\frac{-\ln \left(\frac{C}{C_0} \right)}{(2h + 1) N_p}} = d_{RS}(t) + d_{RS}^o \quad (III.5)$$

Como puede verse en la expresión (III.1), para el cálculo de d_{RS} se necesita, además del dato experimental del porcentaje de fracción cromatográfica en la que se esté observando la degradación, del valor de dos parámetros estructurales de la macromolécula: el que da el número de pares de nucleótidos medio que poseen las moléculas de esa fracción cromatográfica, N_p , y el que da el intervalo de desestabilización que acompaña a cada rotura.

Para los valores de N_p hemos utilizado los datos del laboratorio de Biofísica de la JEN ya publicados⁽²⁵⁰⁾. Para los valores de h para cada uno de los tratamientos degradativos productores de roturas simples utilizados en este trabajo, hemos aplicado los datos de la literatura, ya comentados en el capítulo I.5. En el caso de rotura simple producida por degradación enzimática, hemos utilizado un valor de $h = 2$ por ser el más comúnmente aceptado en la literatura. Cuando la rotura simple se produce por radiolisis, hemos utilizado el valor $h = 5$ para el cálculo de d_{RS} por parecernos el valor más coherente de entre todos los que aparecen en la literatura.

III.5.2. EXPRESION DE LA d_{RS} EN FUNCION DE LA EXTENSION DE LA DEGRADACION.

El método de cálculo anteriormente descrito para la d_{RS} , aunque tiene la ventaja de que permite dar valores numéricos a la variable natural del proceso, d_{RS} , adolece, sin embargo, del inconveniente de que hay que pre-fijar valores para parámetros moleculares que en este momento son imprecisos, lo cual lo convierte en un método demasiado indirecto de determinación.

En vista de estas consideraciones, hemos optado por contrastarlo, desarrollandolo paralelamente, con otro método de elaboración de datos, basado en la suposición de que la velocidad de producción de roturas simples es una constante.

Aunque el proceso de producción de rotura doble es esencialmente estadístico, se puede hablar de velocidad de producción de rotura simple ya que esta se origina siempre como consecuencia del ataque local de un reactivo (el radical $OH\cdot$ para la radiolisis, los iones OH^- , catalizados por la DNasa, para la degradación enzimática) en uno de los nucleotidos componentes de la molécula de DNA. La cinética de producción de roturas simples puede ser descrita por una ecuación diferencial del tipo:

$$\frac{d N_{RS}}{dt} = k_{RS} [R] [N] \quad (III.6)$$

donde $[R]$ es la concentración molar del reactivo que actúa en cada caso concreto y $[N]$ representa la concentración molar de nucleotidos componentes de la muestra de DNA.

Los valores mas altos de d_{RS} obtenidos en la de-

gradación de muestras de DNA en el desarrollo de este trabajo son siempre muy inferiores a 10^{-2} , lo cual nos indica que menos del 1% de los nucleótidos que forman parte de las moléculas de DNA son alteradas por ataques del reactivo. Esto nos permite suponer la constancia del término $[N]$ con un error menor del 1%.

En el caso de la degradación radiolítica, una vez alcanzado el estado estacionario inmediatamente después del comienzo de la irradiación, la concentración de radicales $OH\cdot$ permanece constante y solo depende de la intensidad de dosis y concentración de DNA⁽²⁵⁰⁾. En este caso, por tanto, podemos considerar constante el término $[R]$. Con mas razón en el caso de degradación enzimática, donde el equilibrio de disociación del agua garantiza la constancia de $[OH^-]$.

Por consiguiente, en los dos métodos degradativos productores de roturas simples utilizados en este trabajo, los términos $[R]$ y $[N]$ pueden considerarse independientes del tiempo, con lo que la integración de la ecuación diferencial (III.6) conduciría a una expresión del tipo:

$$N_{RS} = k_{RS} [R] [N] + cte$$

o, dividiendo por $[N]$ y explicitando la constante de integración:

$$d_{RS} = K_{RS} t + d_{RS}^0 \quad (III.7)$$

resultando la producción de roturas simples como una pseudorreacción de orden cero.

Sin embargo, la constancia de los términos $[N]$ y $[R]$ solo será válida en ciertos márgenes de concen-

traciones relativas⁽²⁵⁰⁾. Hemos podido comprobar la situación adecuada de nuestras condiciones experimentales dentro de esos márgenes al verificar que, para los datos experimentales que hemos obtenido, las d_{RS} calculadas según el procedimiento descrito en III.5.1 son lineales respecto al tiempo de tratamiento. Si bien esta prueba es deficiente porque utiliza valores de d_{RS} calculados y no determinados directamente, en cambio sirve de comprobación de que ambas aproximaciones son suficientemente buenas.

En la expresión (III.7) la d_{RS} queda explicitada en función del tiempo de tratamiento. En el caso de degradación enzimática esta puede ser una buena variable para indicar la extensión del tratamiento, ya que ~~se~~ actuó siempre a una misma relación DNA/DNasa; la d_{RS} producida durante el tratamiento con DNasa vendría dada por:

$$d_{RS} = k_1 t_D \quad (III.8)$$

En cambio, en el caso de degradación radiolítica interesa más expresar la extensión de la degradación en función de la dosis, D , para independizarse de la intensidad de dosis aplicada al irradiar, quedando como expresión para la d_{RS} producida

$$d_{RS} = k_2 D \quad (III.9)$$

Las constantes k_1 y k_2 representan constantes de eficacia de producción de roturas simples por nucleótido y por unidad de tiempo o por unidad de dosis, respectivamente.

Esta segunda forma de expresión para la d_{RS} , aun que no lleva a valores numéricos para ella por no conocer el valor de las constantes k_1 y k_2 , permiten, en cambio, realizar el ajuste de los datos experimentales fre-

te a la extensión del tratamiento degradativo. Al sustituir cualquiera de las expresiones para la d_{RS} (III.8) o (III.9) en la expresión de polimerización obtenida (II.10), se podrá realizar su ajuste a los datos experimentales por un proceso de minimización respecto a to dos los parámetros implicados que conduzca a los mejores valores de éstos para la expresión conseguida.

III.5.3. EXPRESIONES PARA LA POLIMERIZACION PARA CADA UNO DE LOS METODOS DE DEGRADACION UTILIZADOS.

Cuando se utiliza cualquiera de las expresiones comentadas para d_{RS} sustituyéndolas en la expresión obtenida para la polimerización (II.10) en función de d_{RS} , se logra explicitar la polimerización en función de los datos experimentales directos que dan la extensión del tratamiento degradativo previo a que se somete la muestra de DNA utilizada como molde.

Es conveniente simplificar la expresión general dada para polimerización (II.10), concretándonos a las características de cada caso particular según el método de degradación utilizado.

III.5.3.1. Degradación enzimática.

Cuando la degradación de la muestra se realiza por tratamiento con DNasa, todas las roturas simples producidas conducen a la obtención de grupos (3')-OH libres (ver capítulo I.1). Al no producirse ningún otro grupo extremo será $d_R = 0$ en la expresión (II.10), que queda entonces simplificada a la forma:

$$P = K N \left[d_{(3')OH}^{\circ} + d_{(3')OH}(t_D) - (2h_{(3')OH} + 1) \left[d_{(3')OH}^{\circ} + d_{(3')OH}(t_D) \right]^2 \right] \quad (III.10)$$

Si en esta expresión se sustituye $d_{(3')OH}(t_D)$ expresandola en función del tiempo de tratamiento con DNasa según la expresión (III.8)

$$P = K N \left[d_{(3')OH}^{\circ} + k_1 t_D - (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^{\circ} + k_1 t_D)^2 \right]$$

o bien, desarrollando el cuadrado y reagrupando términos

$$P = N K \left[d_{(3')OH}^{\circ} - (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^{\circ})^2 + \left[1 - 2(2h_{(3')OH} + 1) d_{(3')OH}^{\circ} \right] k_1 t_D - (2h_{(3')OH} + 1) (k_1 t_D)^2 \right] \quad (III.11)$$

Donde se observa que la polimerización obtenida es proporcional a la cantidad de DNA puesto en la incubación, expresado en número total de nucleótidos, depende de la densidad inicial de extremos $(3')\text{-OH}$ que el DNA poseía antes de aplicarsele el tratamiento de degradación a causa del aislamiento; y varía cuadráticamente con el tiempo de incubación con DNasa aplicado para la degradación del DNA. Al ir degradando cada vez mas las muestras de DNA, la polimerización aumentará inicialmente, hasta que el término cuadrático adquiera valores mayores que el de primer grado; a partir de entonces la polimerización disminuye al incrementar la degradación. Aparece incluido en la expresión el intervalo de desestabilización que corresponde a una rotura simple enzimática.

Si se cumple por cierta la teoría expuesta aquí, los valores experimentales obtenidos con las muestras de DNA diferentemente degradadas por incubación con DNasa, deberían ser ajustables a una parábola, al expresarlos en función del tiempo de tratamiento. Los coeficientes de esa parábola, ajustables, serían:

- Para el término cuadrático:

$$-KN (2h_{(3')OH} + 1) k_1^2$$

- Para el término de primer grado:

$$KN (1 - 2(2h_{(3')OH} + 1) d_{(3')OH}^0) k_1$$

- Para el término independiente:

$$KN \left[d_{(3')OH}^0 - (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^0)^2 \right]$$

para el ajuste, el término independiente se puede simplificar eliminando el término de densidad al cuadrado frente al de densidad, con lo que quedará como: $KN d_{(3')OH}^0$. Los parámetros ajustables serán K, k_1 , $d_{(3')OH}^0$ y $h_{(3')OH}$.

III.5.3.2. Degradación radiolítica.

Cuando se degrada la muestra de DNA por irradiación con gamma, no hay razones para suponer, como comentamos en el capítulo I.2., que alguna de las roturas simples producidas dan lugar a extremos con grupos (3')-OH libres aptos para la polimerización. Si incluimos esto dentro de nuestra hipótesis, haciendo que para la degradación radiolítica sea $d_{(3')OH}(t_D) = 0$ en la expresión (II.10), esta expresión para la polimerización que

dará simplificada en la forma:

$$P = K N \left[d_{(3')OH}^{\circ} - (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^{\circ})^2 - \right. \\ \left. - \left[(h_{(3')OH} + h_R + 1) d_{(3')OH}^{\circ} + \alpha \right] d_R(D) \right] \quad (III.12)$$

Si en esta expresión se sustituye la densidad de grupos liberados durante la degradación, $d_R(D)$, expresándola en función de las dosis comunicadas en las muestras de DNA según la expresión (III.9), resulta:

$$P = K N \left[d_{(3')OH}^{\circ} - (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^{\circ})^2 - \right. \\ \left. \left[(h_{(3')OH} + h_R + 1) d_{(3')OH}^{\circ} + \alpha \right] k_2 D \right] \quad (III.13)$$

donde se observa que la polimerización obtenida es proporcional a la cantidad de DNA puesto en la incubación, expresada en número total de nucleótidos que constituyen las cadenas, depende de la densidad de roturas simples iniciales con grupos (3')-OH que posee el DNA previamente al tratamiento, disminuye linealmente con la dosis aplicada al DNA para degradarlo, apareciendo incluidos en la expresión los valores de los intervalos de desestabilización alrededor de las roturas simples radiolítica y enzimática.

Si realmente se cumple lo expuesto hasta aquí, los valores experimentales de polimerización debería ser ajustables a una recta al expresarlos en función de la dosis aplicada al DNA para su degradación. Los términos ajustables serían:

- Como ordenada en el origen:

$$KN \left[d_{(3')OH}^{\circ} - (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^{\circ})^2 \right]$$

- Como pendiente:

$$-KN k_2 \left[(h_{(3')OH} + h_R + 1) d_{(3')OH}^{\circ} + \alpha \right]$$

Igualmente a como se hizo en el apartado anterior, la ordenada en el origen se puede simplificar, para el ajuste, eliminado el término de densidad la cuadrado frente al de densidad, con lo que quedará como $KN d_{(3')OH}^{\circ}$.

Los parámetros ajustables en este caso serán K , k_2 , $d_{(3')OH}^{\circ}$, h_R , $h_{(3')OH}$ y α . Como veremos en la presentación de los resultados, en el ajuste realizado se simplificó la expresión (III.13) eliminando el parámetro α por considerar muy pequeña la probabilidad de reacción directa de los radicales $OH\cdot$ con el nucleótido terminal de los extremos $3'$.

III.5.3.3. Degradación mecánica.

Si se degradan las muestras de DNA por agitación a altas velocidades no habrá variación del número de roturas simples existentes en la muestra, como comentamos en el capítulo I.4.

Haciendo $d_{(3')OH}(t_D) = 0$ y $d_R(D) = 0$ en la expresión (II.10), la expresión para la polimerización quedará simplificada en la forma:

$$P = KN \left[d_{(3')OH}^{\circ} - (2h_{(3')OH} + 1)(d_{(3')OH}^{\circ})^2 \right] \quad (III.14)$$

donde la polimerización obtenida aparece, como en los casos anteriores, proporcional a la cantidad de DNA pues to en la incubación y a la densidad de roturas simples con grupo $(3')\text{-OH}$ inicial, apareciendo completamente in

dependiente del tiempo de tratamiento para producir la degradación o de cualquiera otro parámetro que refleje el grado de degradación sufrida por el DNA.

Según esto, los valores experimentales de polimerización obtenidos utilizando DNA diferentes, mecánicamente degradados, deberían ser ajustables, al correlacionarlos con tiempo y posición de velocidad de la degradación, a una recta del tipo $P = \text{constante}$. La constante, ajustable, es:

$$\text{constante} = KN \left[d_{(3')OH}^{\circ} - (2h_{(3')OH} + 1) (d_{(3')OH}^{\circ})^2 \right]$$

Igualmente aquí también se simplifica el término de densidad al cuadrado para el ajuste, con lo que quedará:

$$\text{constante} = KN d_{(3')OH}^{\circ} \quad (III.15)$$

resultando como parámetros ajustables K y $d_{(3')OH}^{\circ}$.

IV.1. COMPROBACION EXPERIMENTAL DE LOS PROCESOS DE DEGRADACION.

Una de las preocupaciones constantes que hemos tenido en la realización de todo el trabajo experimental ha sido mantener las preparaciones de DNA en estado "nativo", respondiendo a las características de la estructura Watson-Crick. Las caracterizaciones realizadas rutinariamente sobre cada una de las muestras de DNA utilizadas, y que aparecen descritas en el capítulo dedicado a materiales y métodos experimentales, garantizan que las muestras se encontraban en estado "nativo" antes de cada experiencia.

Posteriormente a los tratamientos de degradación utilizados, por los diferentes métodos y en el grado en que han sido aplicados en estas experiencias las moléculas de las muestras conservan su estructura doble helicoidal, aunque han sufrido alteraciones locales de su estabilidad.

IV.1.1. ASPECTOS CINETICOS.

En las figuras 8, 9, y 10 se muestra la variación de la curva de transición de las muestras de DNA diferentemente degradadas por cada uno de los métodos utilizados en este trabajo, en función de la dosis de radiación recibida para el caso de degradación radio-lítica, el tiempo de incubación con DNasa cuando la degradación se hizo por vía enzimática, o el producto del tiempo de tratamiento por la posición de velocidad del homogenizador, cuando la degradación se realizó por vía mecánica. Se observa en esas figuras que tanto para el

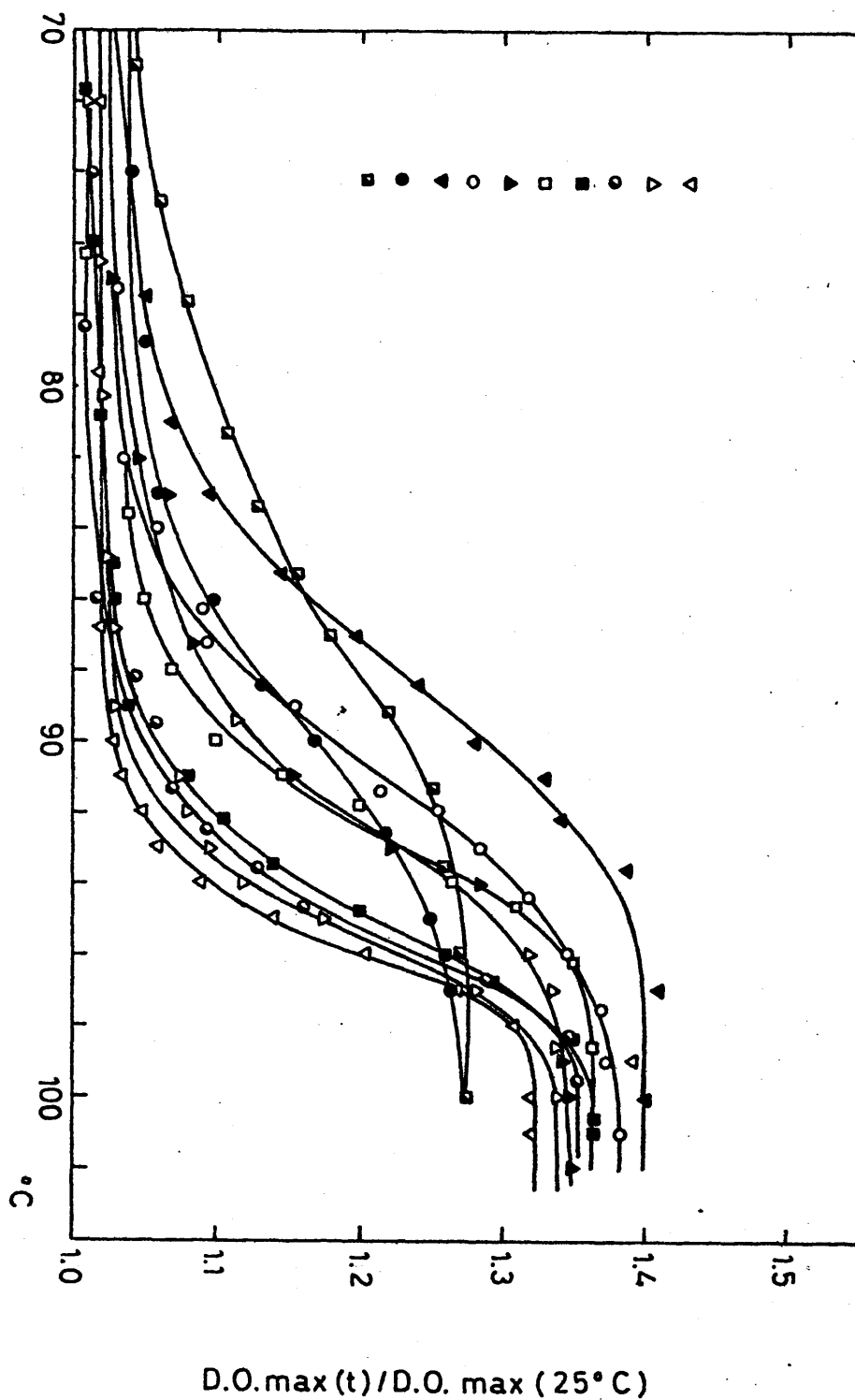


Figure 8

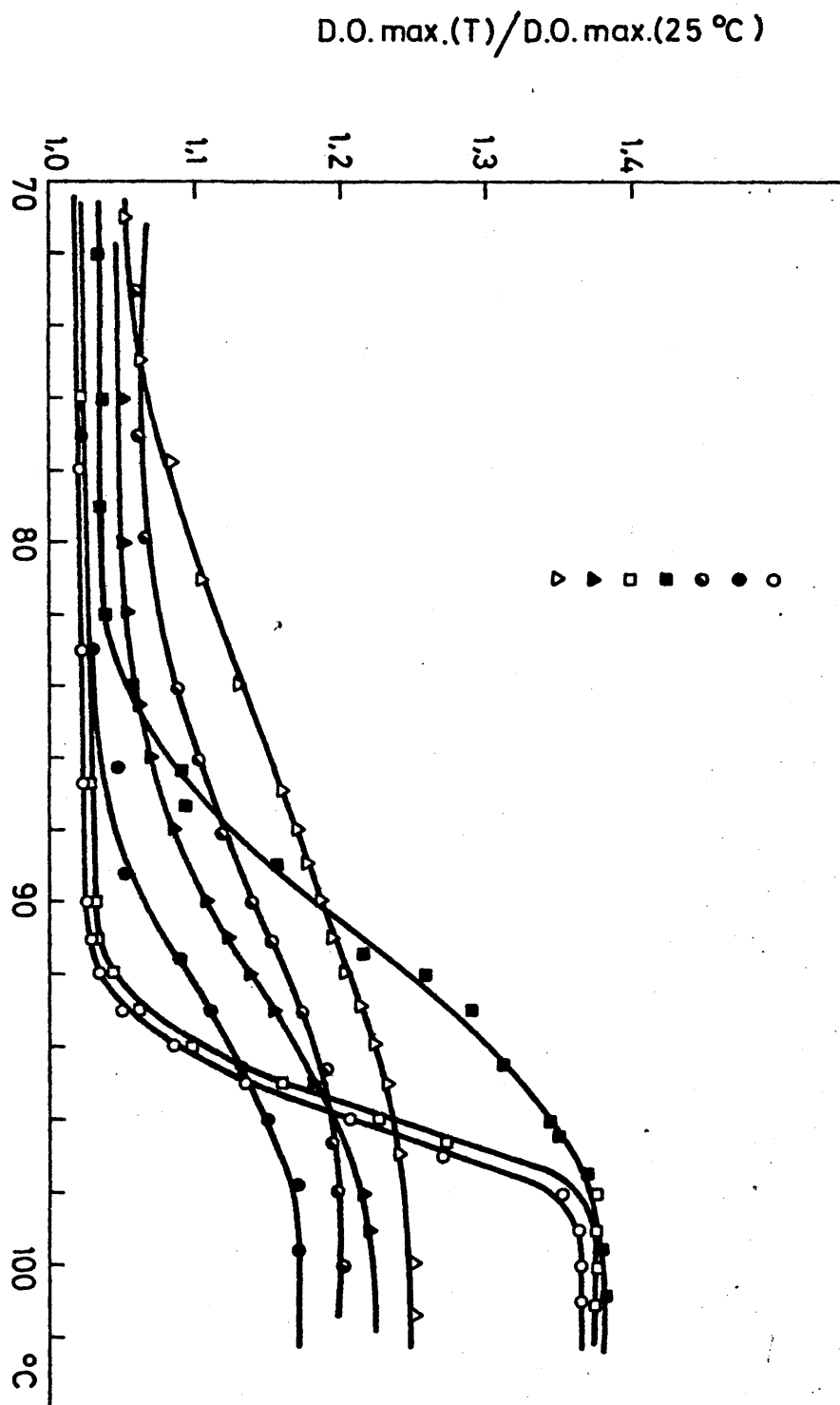


Figura 9

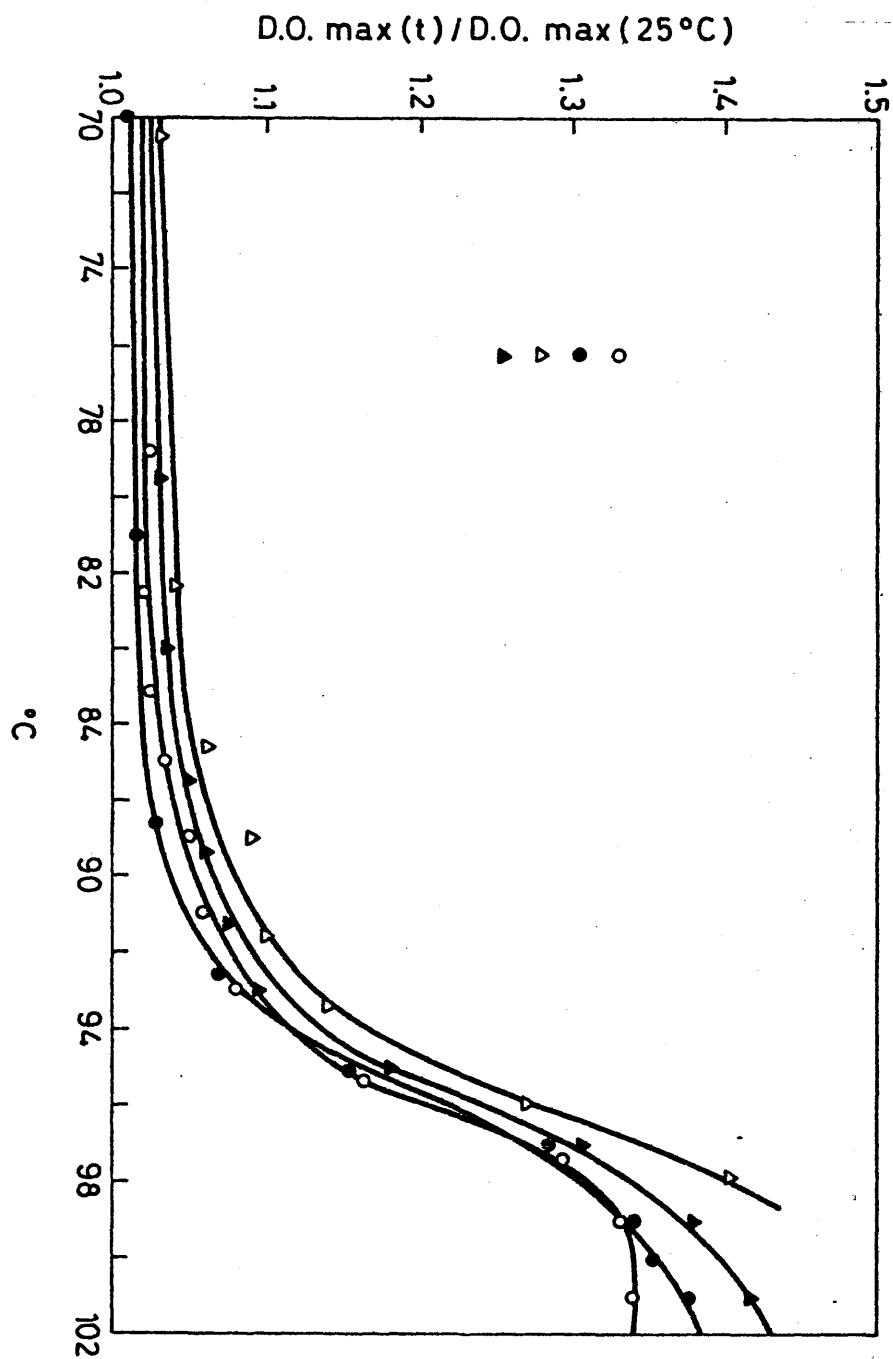


Figure 10

caso de degradación radiolítica como para el de degradación enzimática, la modificación mas importante producida en la mayoría de las muestras sobre la curva de transición es un desplazamiento hacia zonas de mas baja temperatura, manteniéndose, por el contrario, constante la magnitud del efecto hipercrómico observado. Se puede ver que el desplazamiento es tanto mayor cuanto mas grande es la alteración sufrida por la muestra. En el caso de degradación radiolítica y enzimática, figuras 8 y 9, solamente aquellas muestras que han sufrido una degradación muy fuerte para llevarlas hasta pesos moleculares medios inferiores a $2,6 \times 10^6$ Daltons, presentan, además, un efecto hipercrómico bajo, junto con una modificación importante de la forma de la curva, alargándose mucho la zona de temperaturas en que se produce la transición, que se realiza de una forma mas gradual. Estas muestras fueron degradadas hasta pesos moleculares muy bajos con el fin de poder señalar la forma de la curva de polimerización en las zonas de alta degradación para cada uno de los métodos degradativos utilizados en este trabajo.

En el caso de realizar la degradación por vía mecánica, figura 10, se observa que, incluso para la muestra mas degradada, se conserva la forma de la curva, produciéndose un ligero desplazamiento hacia zonas de temperaturas menores al aumentar la degradación; desplazamiento que aparece muy pequeño cuando se le compara con el que experimentan las muestras degradadas vía roturas simples, sobre todo cuando se tiene en cuenta que la muestra mas degradada mecánicamente, tiene análogo peso molecular medio, aunque un diagrama de elución diferente (Tablas 16, 17 y 18), que la muestra sometida a una dosis de 663 Krads o que la muestra incubada con DNasa durante 60 minutos, en las que el desplazamiento de las curvas es mucho mayor.

TABLA 16

DNA degradado radiolíticamente

<u>D</u>	<u>PM medio</u>	<u>F3+4</u>	<u>F5</u>	<u>FVI</u>
0 Krad	18,3.10 ⁶	28,1	14,5	57,3
25,5	15,6	25,6	10,7	63,7
51,0	13,7	24,7	11,1	64,2
102,0	8,4	28,4	16,8	53,8
153,0	7,8	33,5	19,8	46,8
204,0	5,6	34,2	25,8	39,9
408,0	4,5	40,8	30,1	29,1
510,0	3,4	47,2	32,9	19,4
663,0	3,8	46,6	28,3	25,2
1020,0	2,6	57,1	31,8	11,1
1530,0	2,1	68,4	25,2	6,5

TABLA 17

DNA tratado con DNasa

<u>t_D</u>	<u>PM medio</u>	<u>F3+4</u>	<u>F5</u>	<u>FVI</u>
0 min	15,25.10 ⁶	25,5	9,8	64,79
30	10,47	30,3	16,3	53,40
60	3,72	60,0	19,3	20,77
90	1,62	83,4	12,6	4,10
150	1,23	93,4	5,2	1,40
270	1,13	96,1	3,1	0,82
390	1,03	99,0	0,8	0,14

TABLA 18

DNA tratado con homogenizador a alta velocidad

<u>txv</u>	<u>PM medio</u>	<u>F3+4</u>	<u>F5</u>	<u>FVI</u>
0	14,6.10 ⁶	35,9	14,0	50,1
0,5	9,9	44,8	19,3	35,4
1	9,6	48,5	18,2	33,4
2	9,7	46,3	16,8	36,8
5	8,2	48,9	21,4	29,6
10	7,5	49,8	25,0	26,1
15	7,4	47,0	27,6	25,5
25	6,3	49,0	28,1	22,9
35	4,8	55,2	27,2	17,7
45	4,3	59,8	24,7	15,5
50	3,7	63,3	23,5	13,3

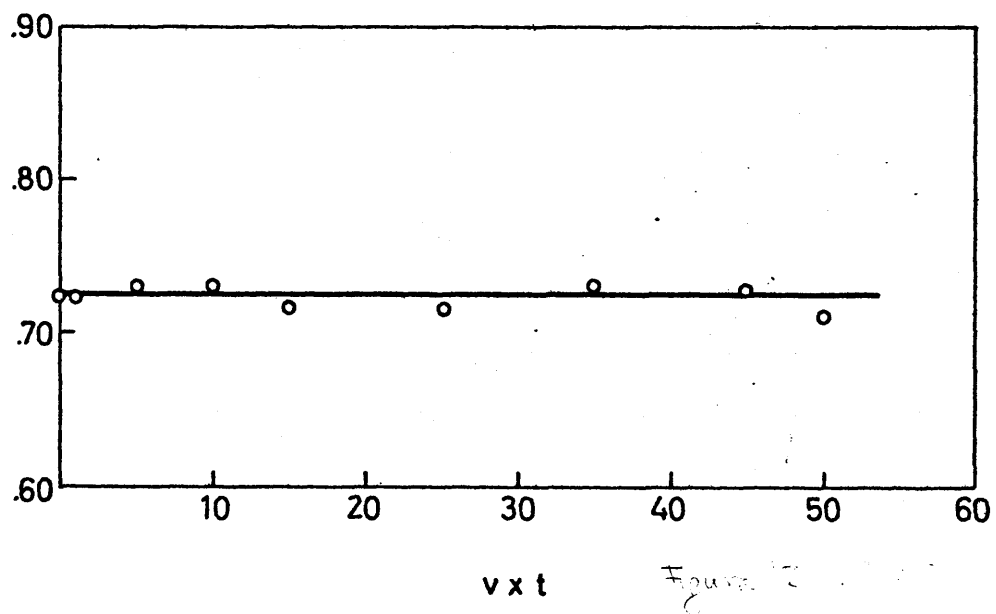
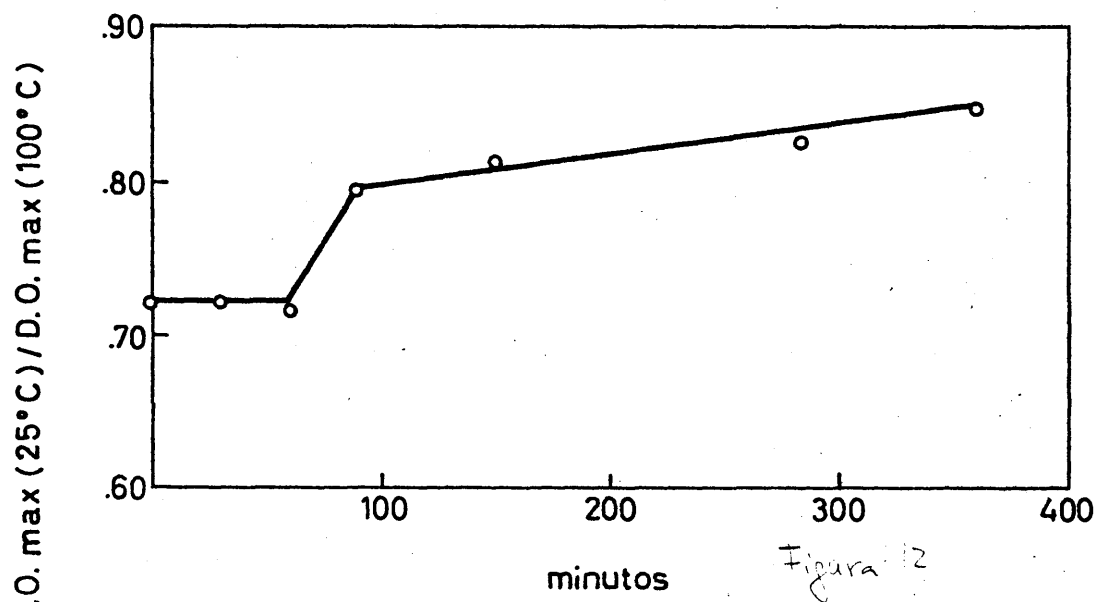
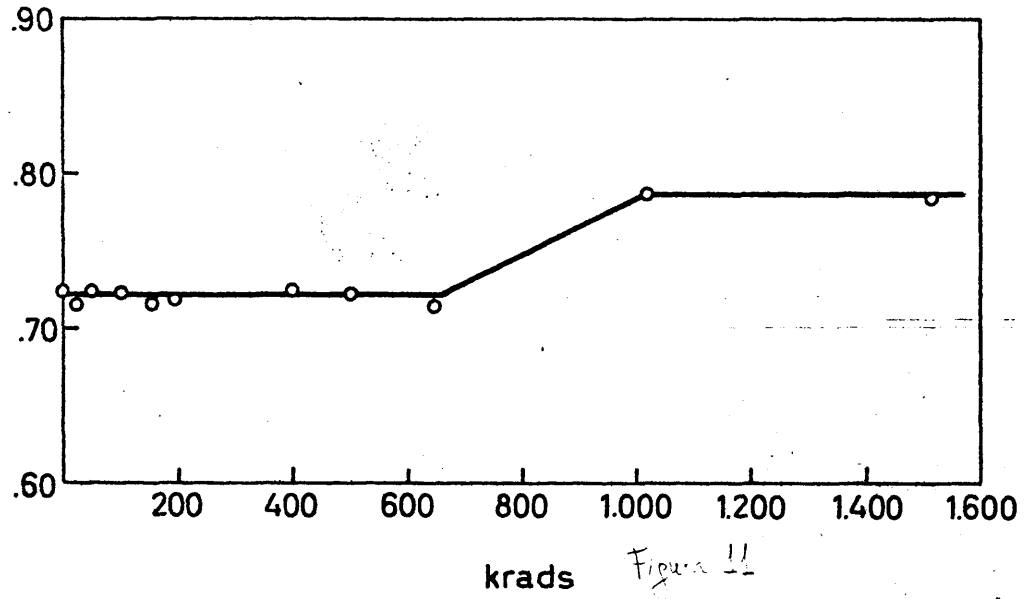
De la observación de las figuras 8 y 9 se llega a la conclusión de que la muestra ha sufrido una pérdida de cooperatividad en la transición, consecuencia de las roturas simples producidas en la degradación. Para dosis no excesivamente altas y tiempos de tratamientos con DNasa pequeños, se observa que las muestras degradadas no han sufrido ninguna desnaturación, ya que presentan un efecto hipercrómico oscilando alrededor del valor 1,37 para el DNA de *P. savastanoi* nativo. Esto lo podemos interpretar en el sentido de que se conserva, la estructura en la cual es posible el apilamiento; es decir, la molécula responde, en su mayor parte, y a pesar de la existencia de las roturas simples, a las características de la doble hélice. Solo cuando el número de roturas simples crece mucho por haber irradiado hasta dosis

muy altas, o incubando durante tiempos grandes, se producen zonas en la cadena que no responden a este tipo de estructura, ya que al crecer el número de roturas simples crece la probabilidad de que se produzcan dos roturas simples próximas en una misma cadena, con lo que se crea una zona de desestabilización amplia donde no es probable una estructura Watson-Crick. La aparición, para casos de degradación muy fuerte, de trozos de la cadena donde es posible hablar de zonas de desnaturación, hacen que el efecto hipercrómico presentado por la muestra sea mas bajo que el nativo, llegando para esas dos muestras muy degradadas hasta 1,27, puesto que las moléculas a 25°C están ya parcialmente desnaturadas.

Observamos que, en cambio, figura 10, cuando la degradación se realiza por vía mecánica, el efecto hipercrómico de las muestras diferentemente degradadas se conserva en valores oscilando alrededor de 1,37, lo cual nos hace concluir que las muestras no han sufrido ninguna desnaturación durante el tratamiento y que la estructura de las moléculas responden a las características de doble hélice.

Esta diferencia aparece claramente cuando se comparan las figuras 11, 12 y 13, donde se representa la relación entre la densidad óptica de la muestra a 25°C después de degradación y la densidad óptica que tienen cuando además se ha desarrollado totalmente el efecto hipercrómico por desnaturación térmica, en función de la dosis, el tiempo de incubación con DNasa o el producto tiempo de tratamiento por posición de velocidad del homogenizador, respectivamente, para cada uno de los tres métodos de degradación utilizados en este trabajo.

Igualmente, aparecen claras diferencias entre los mecanismos que venimos comentando en los valores

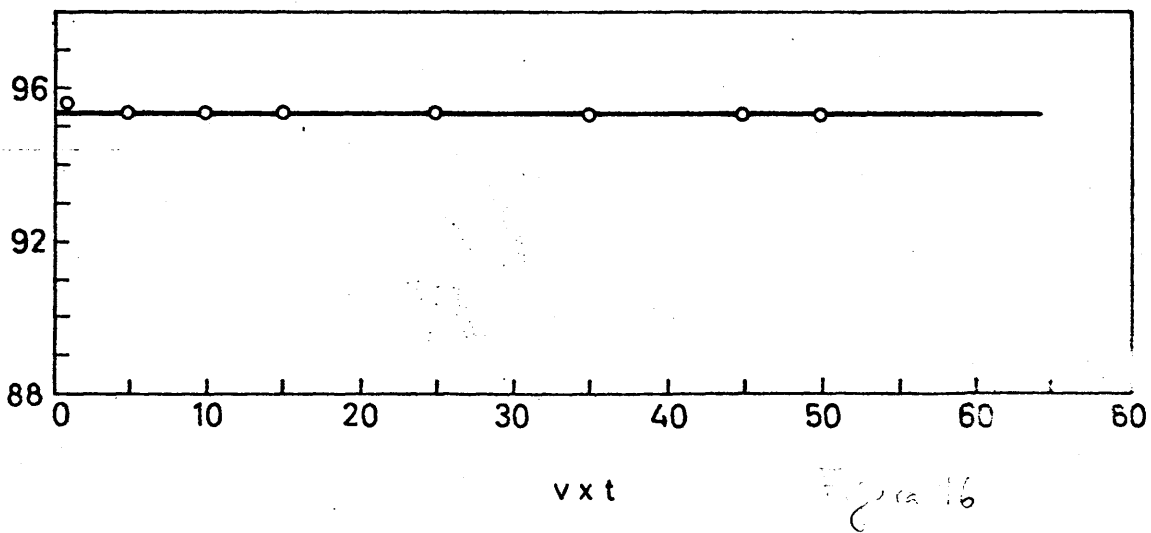
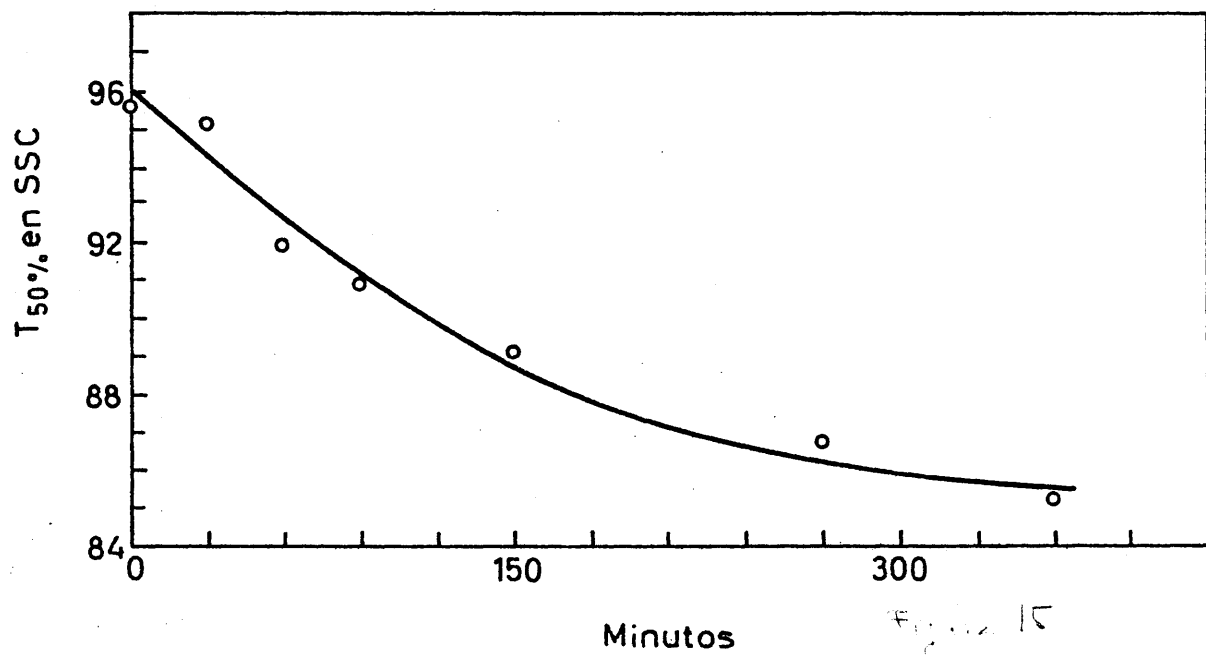
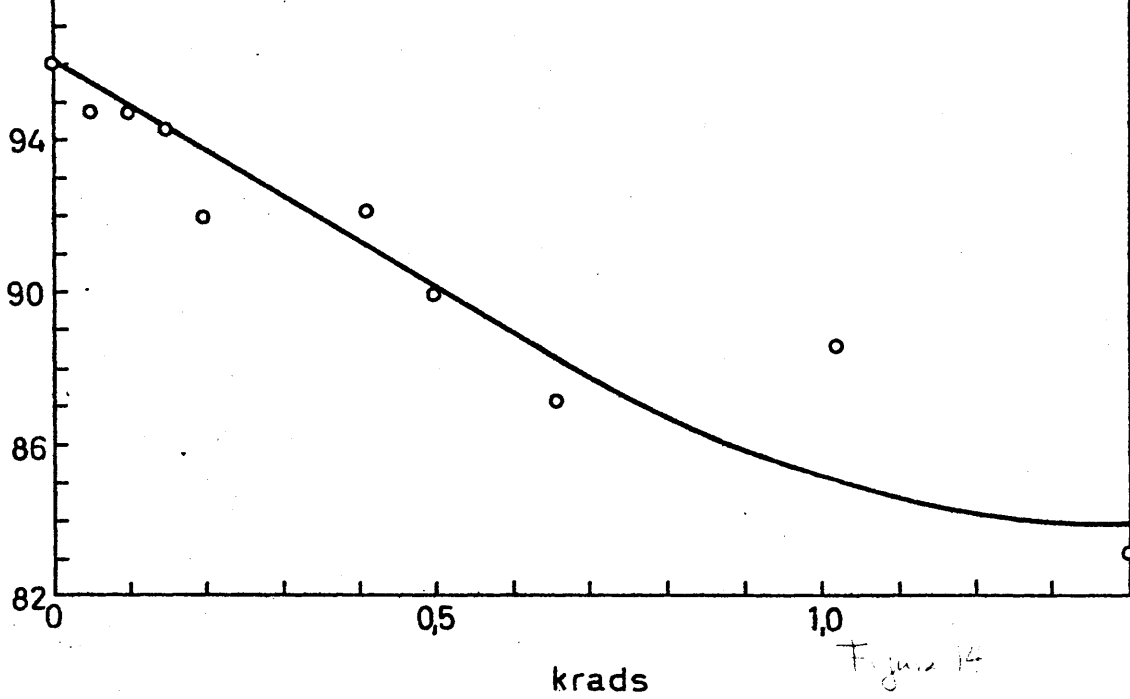


que adquiere la temperatura a la cual se consigue el 50% del incremento de la densidad óptica. En el caso de degradación vía mecánica se observa (figura 16) constancia del valor de t_m para todas las muestras. Para el caso de degradación vía roturas simples se observa, figuras 14 y 15, que el valor de t_m disminuye rápidamente al aumentar la degradación de la muestra.

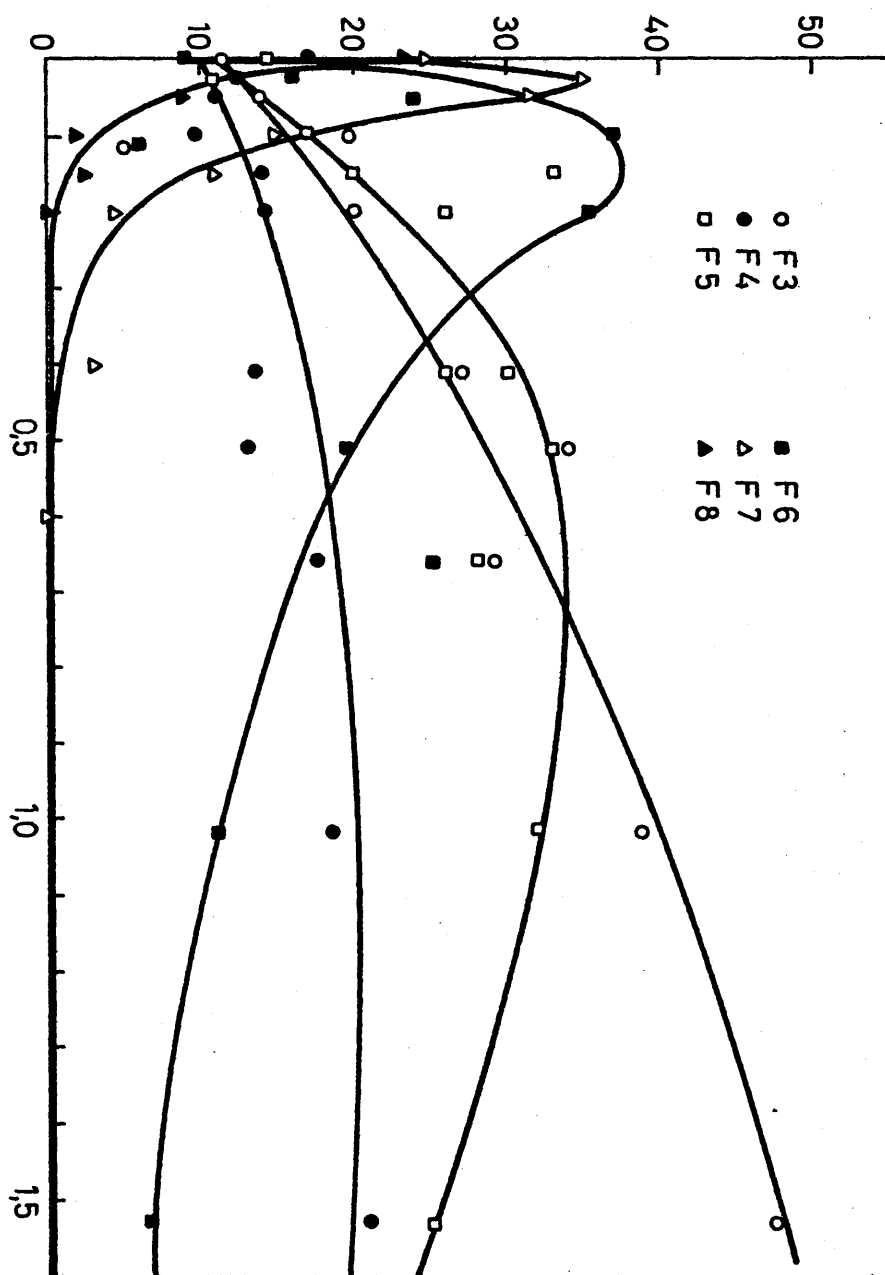
Por tanto, las pruebas aportadas demuestran que no se modifica sustancialmente, como consecuencia de la degradación a la que se las somete, la estructura doble helicoidal de las muestras de DNA utilizadas, aunque en algunos casos hayan sufrido alteraciones locales de su estabilidad.

Otro criterio experimental de diferenciación de mecanismos de degradación lo constituye la evolución del diagrama de elución cromatográfica. En las figuras 17, 18 y 19 aparecen las cinéticas de degradación para cada uno de los agentes degradantes utilizados, radiación gamma, DNasa y agitación a altas velocidades, respectivamente, tal y como es posible observarlo mediante cromatografía en DEAE-celulosa. Puede decirse, de la observación de esas figuras que los fenómenos que se representan en las figuras 17 y 18 son similares y, en cambio, claramente distintos del que se muestra en la figura 19. Los predomios sucesivos de las fracciones cromatográficas que se observan en el caso de acción de la DNasa o de la irradiación no aparecen, en absoluto, en el caso de tratamiento mecánico, de acuerdo con las características cinéticas de ambos tipos de mecanismos.

El paralelismo de los mecanismos de degradación radiolítica y enzimática aparece mucho más destacado comparando las figuras 20 y 21. En ellas se representa la evolución del diagrama de elución cromatográfica corres



% D.O.



Krads

1.0

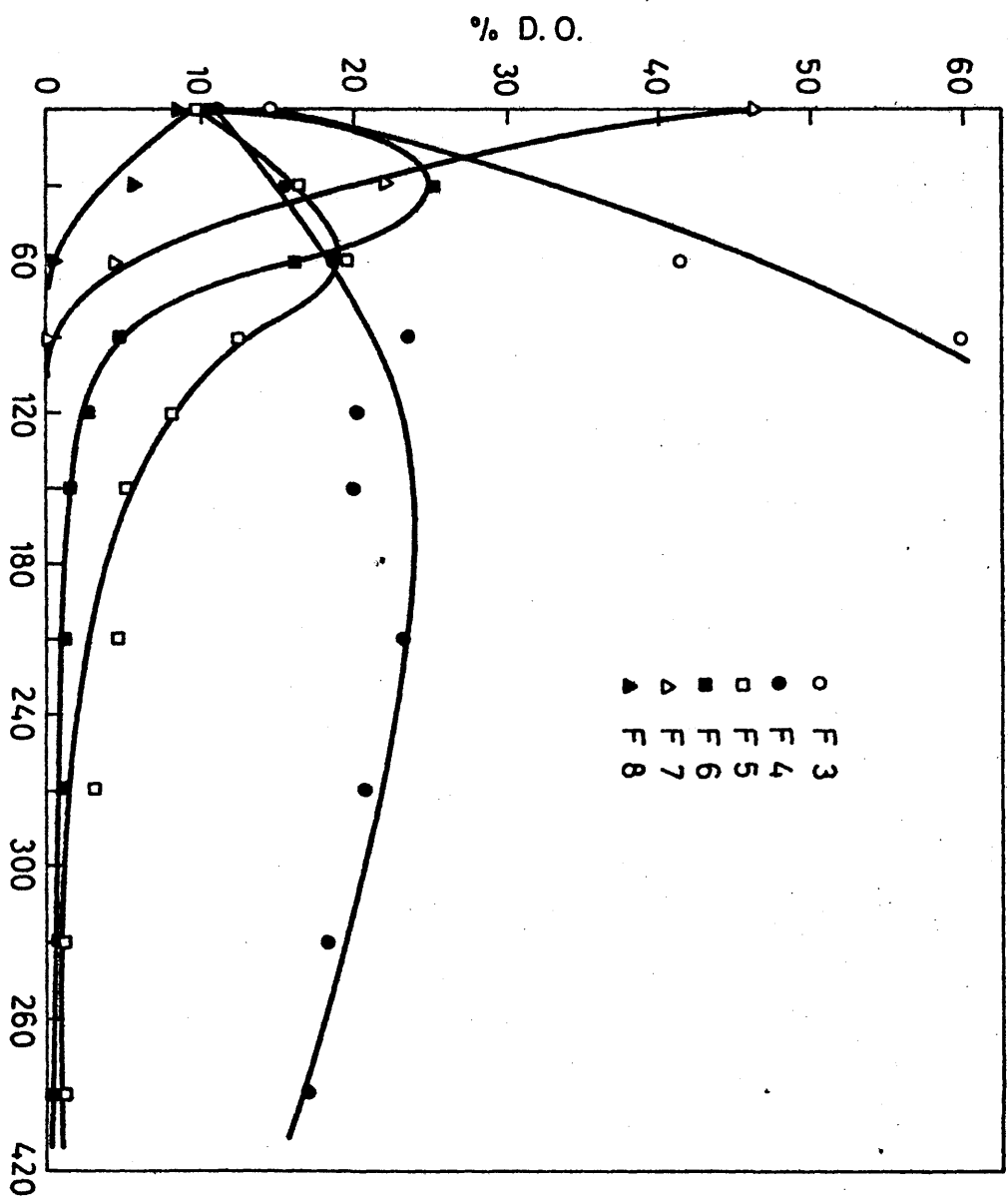
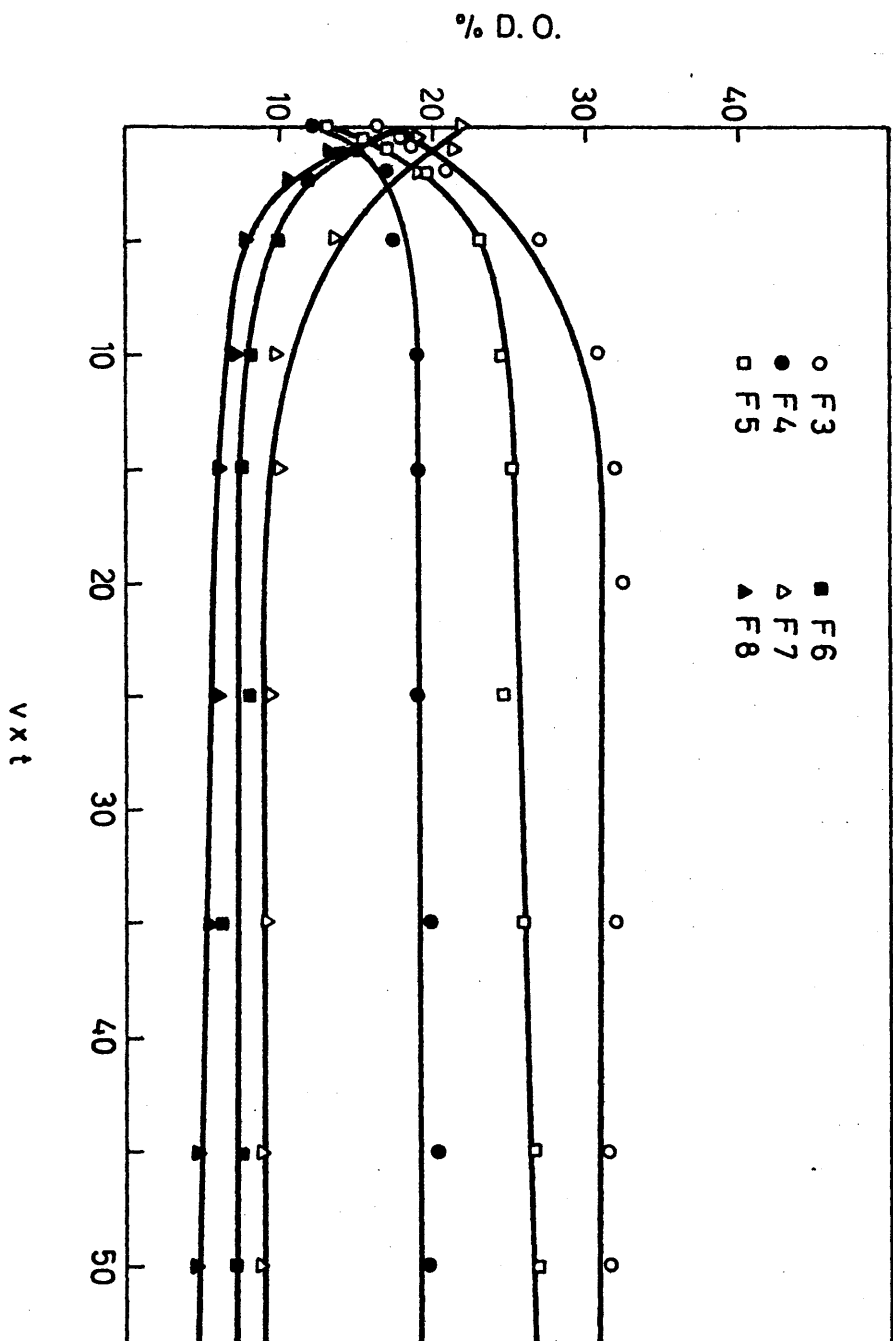
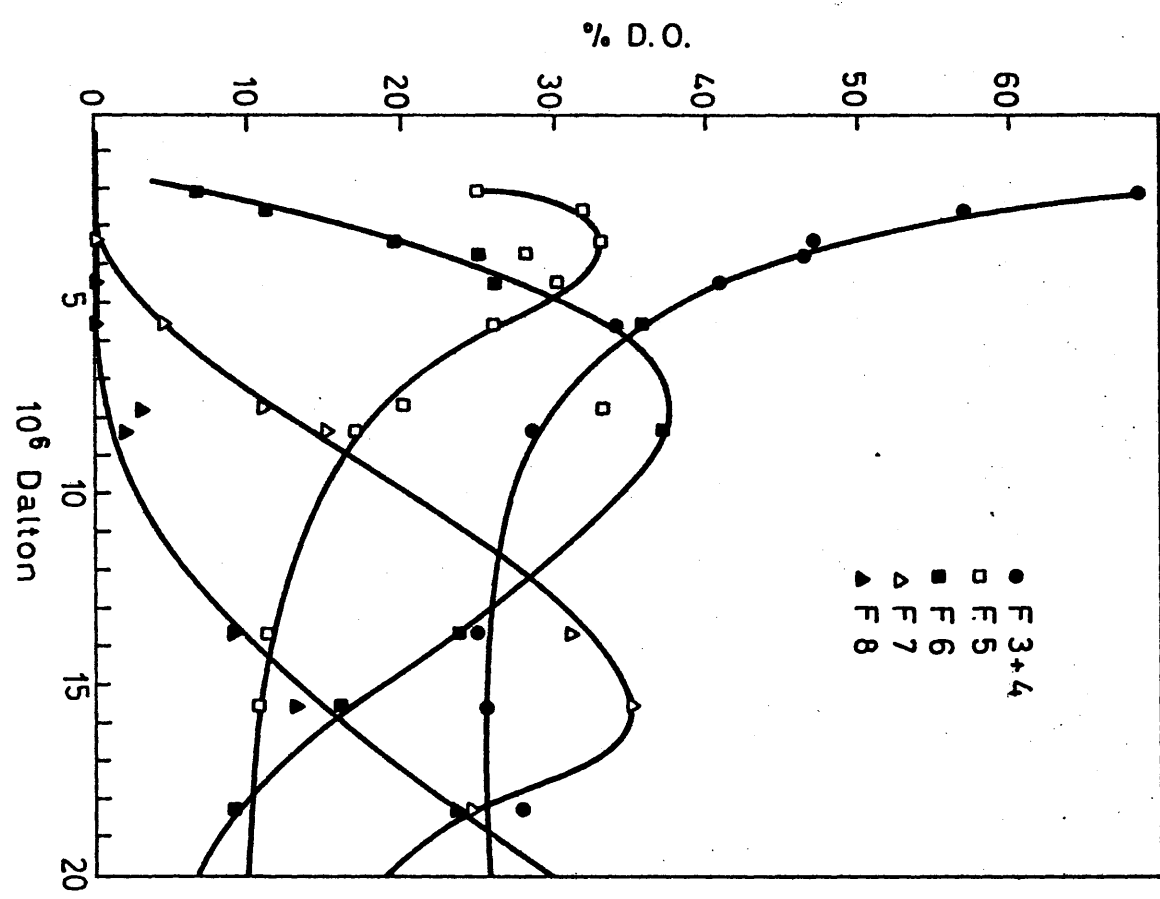
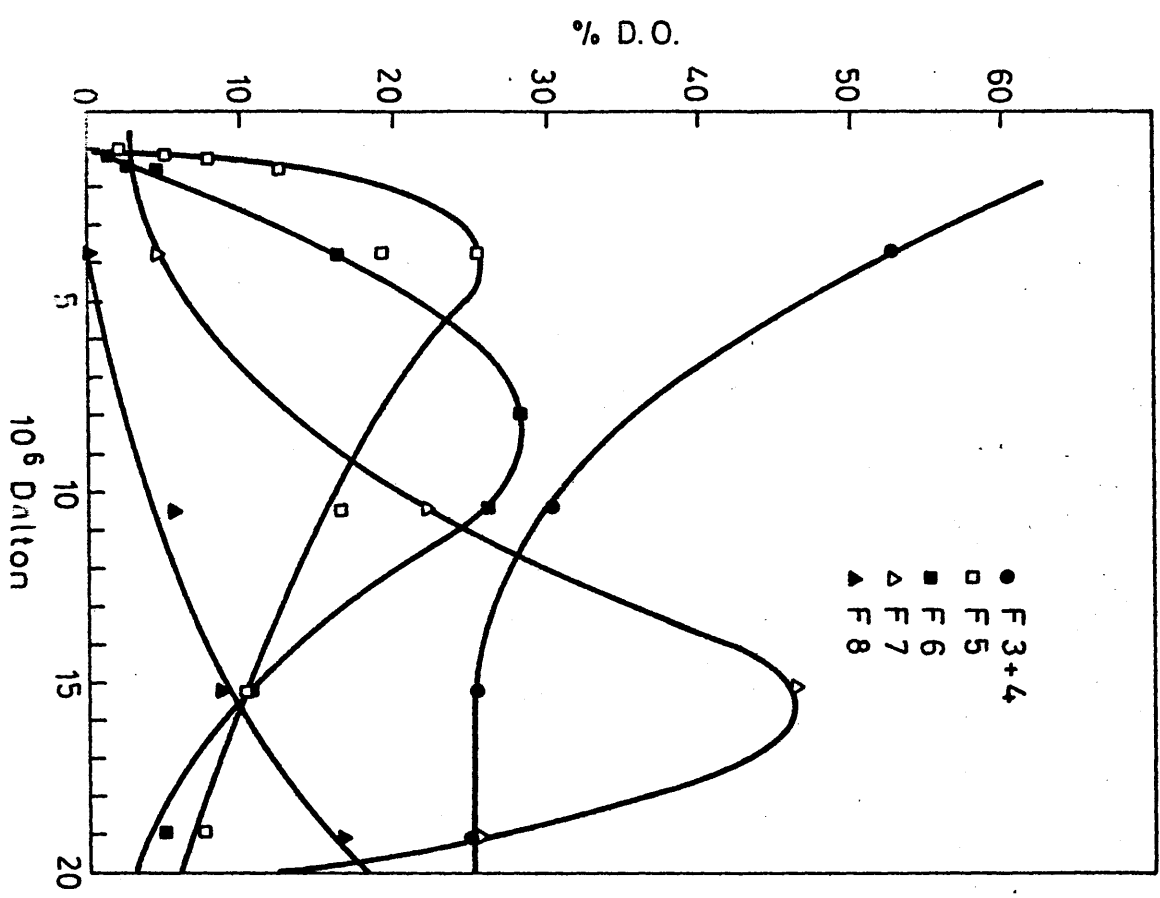


Fig. 18





pondiente a cada peso molecular medio obtenido por radiolisis o por incubación enzimática, respectivamente. De la observación de esas figuras se puede afirmar que cuando se llega a un mismo valor de peso molecular medio bien por degradación radiolítica bien por incubación enzimática, esas muestras tienen similar diagrama de elución, lo cual nos lleva a concluir que las vías por las que se ha llegado a esas degradaciones son similares. En ambas gráficas se pone igualmente de manifiesto que el fenómeno de degradación transcurre a través del predominio sucesivo de fracciones de cada vez menor peso molecular, cosa que es igualmente observable en las figuras 17 y 18.

Mediante la figura 22 se puede observar que no ocurre lo mismo cuando se habla de degradación mecánica. No solo no aparece el fenómeno de predominio sucesivo de fracciones para los distintos pesos moleculares, sino que se puede ver que una muestra degradada por este método llega a un peso molecular determinado con un diagrama de elución completamente distinto al que tendría si la degradación hasta ese mismo peso molecular hubiese transcurrido vía roturas simples.

IV.1.2. PROBABILIDAD DE PRODUCCION DE ROTURAS SIMPLES.

Hemos utilizado dos constantes para la expresión de la probabilidad de producción de roturas simples, k_1 y k_2 . k_1 la designamos como la probabilidad de producción de roturas simples por unidad de tiempo de incubación con DNasa; k_2 es la probabilidad de producción de roturas simples por unidad de dosis. Estas probabilidades por unidad de tiempo o de dosis las hemos considerado como constantes a lo largo de nuestro trabajo, lo cual está de acuerdo con los resulta-

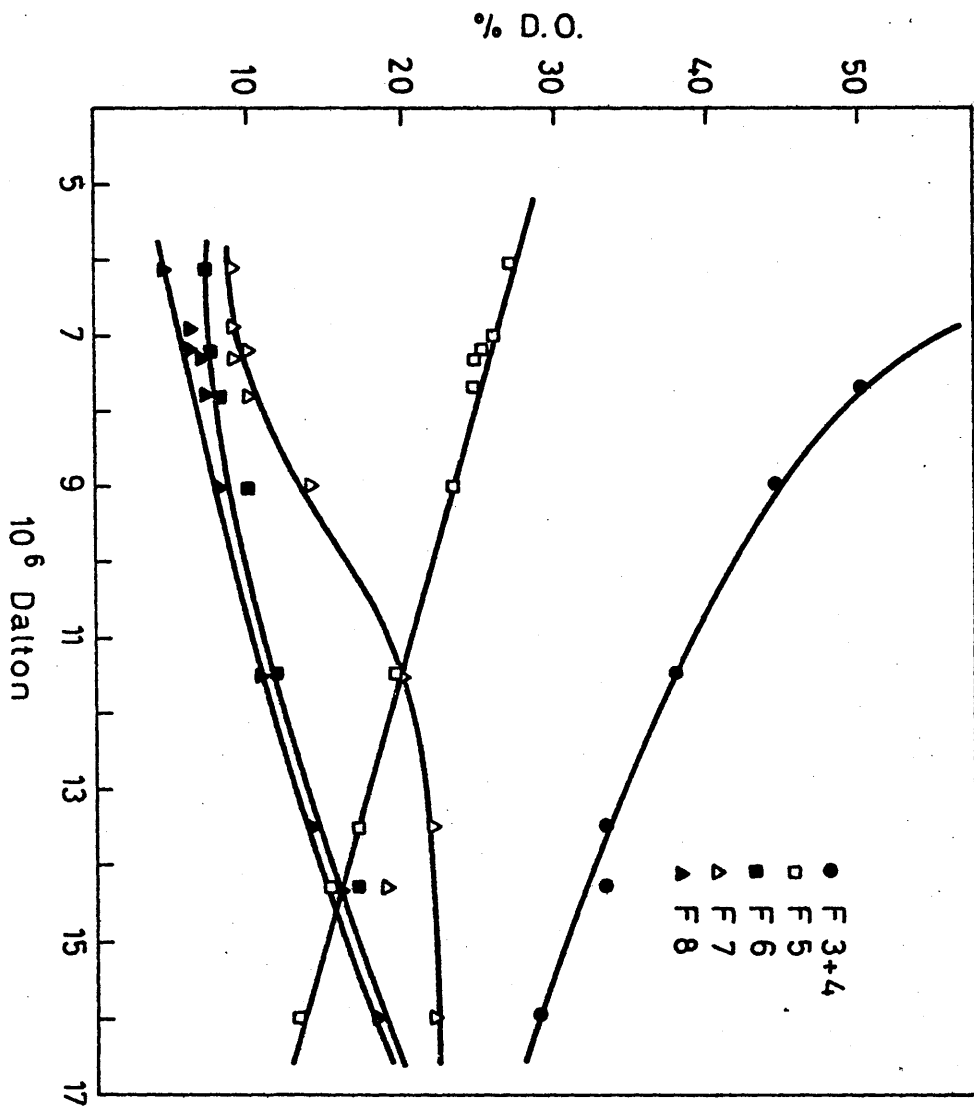


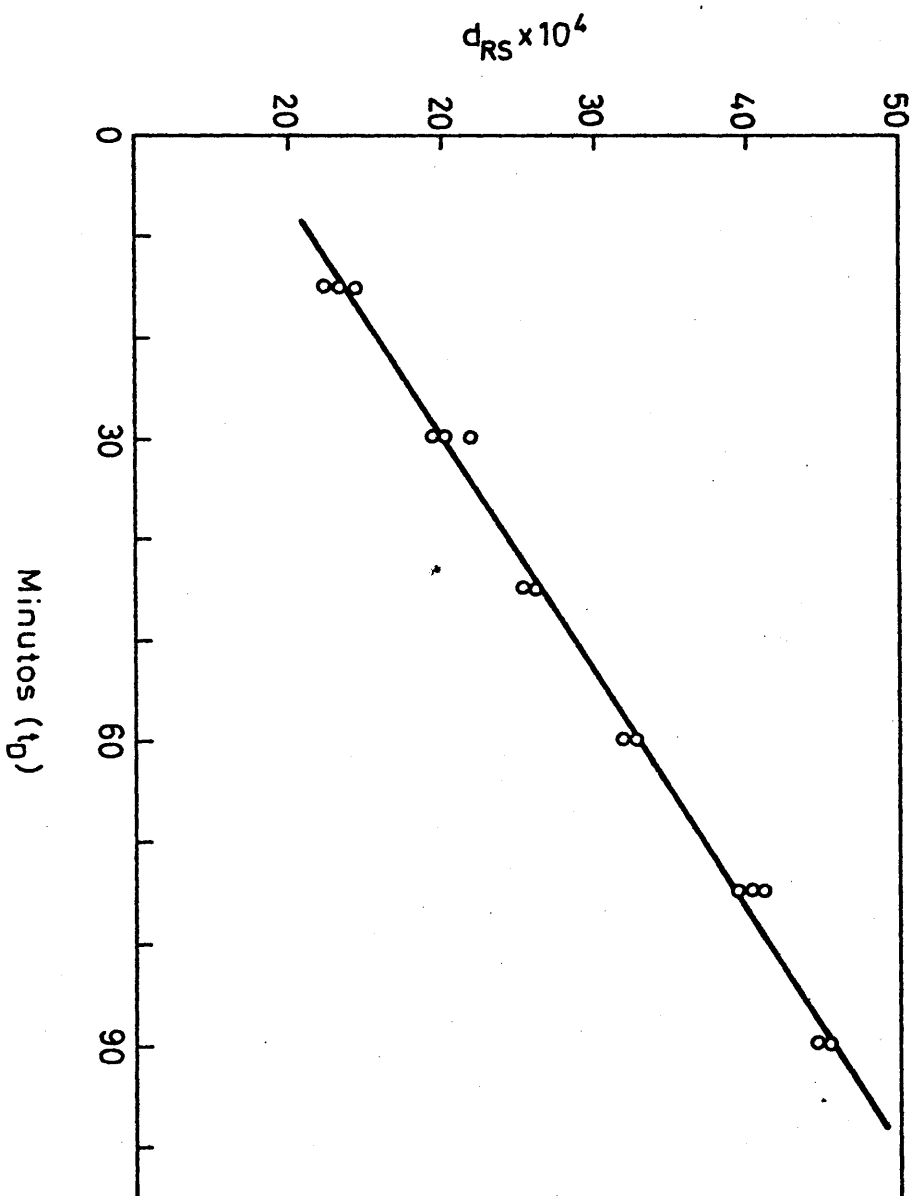
Figure 11

dos expresados en las figuras 23 y 24, donde se representan los valores de d_{RS} en función del tiempo de incubación con DNasa necesario para producirla y de la dosis a que se ha irradiado para conseguirla, respectivamente.

Los valores de d_{RS} han sido calculados a partir de los datos de fraccionamiento cromatográfico sobre DEAE-celulosa, utilizando la expresión (III. 5).

La constancia se produce solo dentro de un intervalo bastante amplio de tiempo de tratamiento y dosis, respectivamente, por encima del cual las constantes k_1 y k_2 varían, como puede verse en las figuras 25 y 26, respectivamente. Aunque la no lineabilidad de las gráficas es un artefacto debido a la sensibilidad del método de observación, en nuestras experiencias, la mayor parte de los puntos se encuentran en la zona de constancia de probabilidad por unidad de tiempo o de dosis y solamente algunos puntos extremos se encuentran por encima de este intervalo.

Estas constantes de probabilidad de producción de roturas simples por unidad de tiempo o de dosis dependen de las condiciones de producción de las roturas simples. En la figura 27 se representa la variación de la constante de probabilidad por unidad de tiempo, k_1 , en función de la relación $\frac{\mu\text{g DNasa}}{\mu\text{g DNA}}$ utilizada para producir la degradación en la muestra de DNA. Cuanto mayor es la relación, tanto mayor es la probabilidad por unidad de tiempo de tratamiento. En nuestra experimentación se realizaron tratamientos con distintas relaciones a fin de encontrar las condiciones de máximo control de producción de roturas simples dentro del intervalo de valores de d_{RS} que deseábamos, pero las experiencias utilizadas para el ajuste están realizadas con



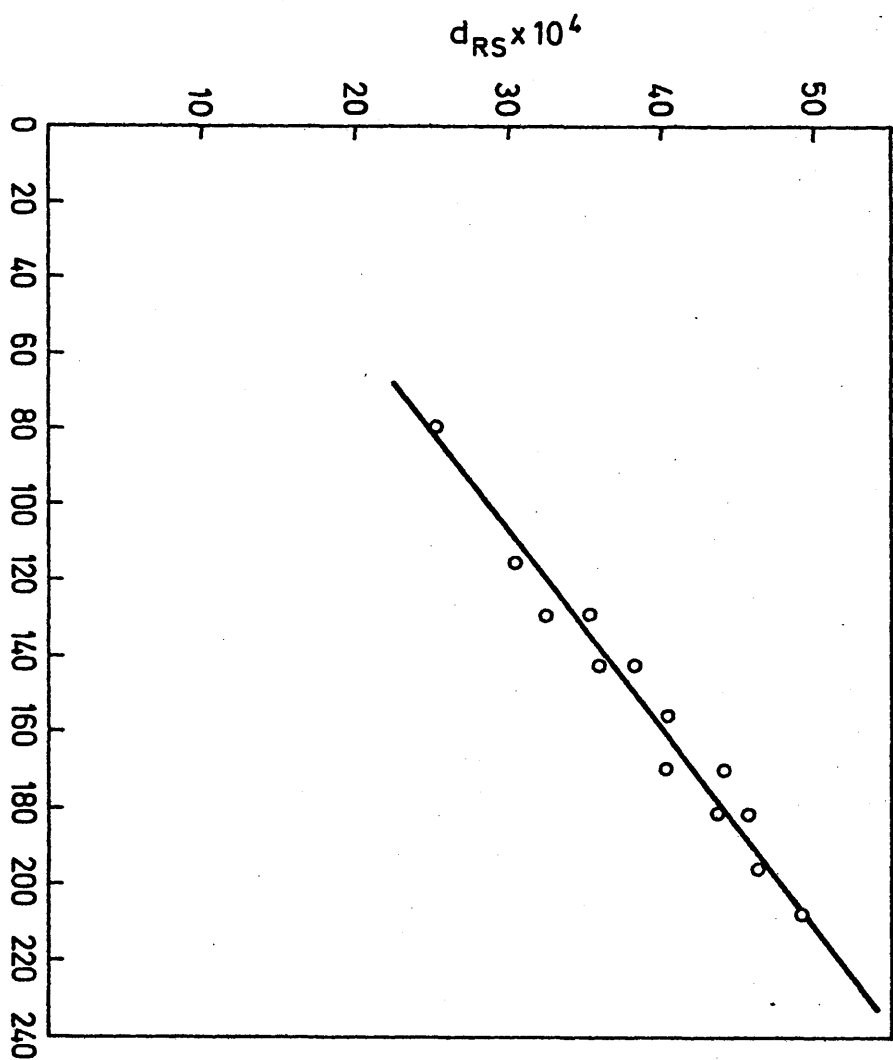
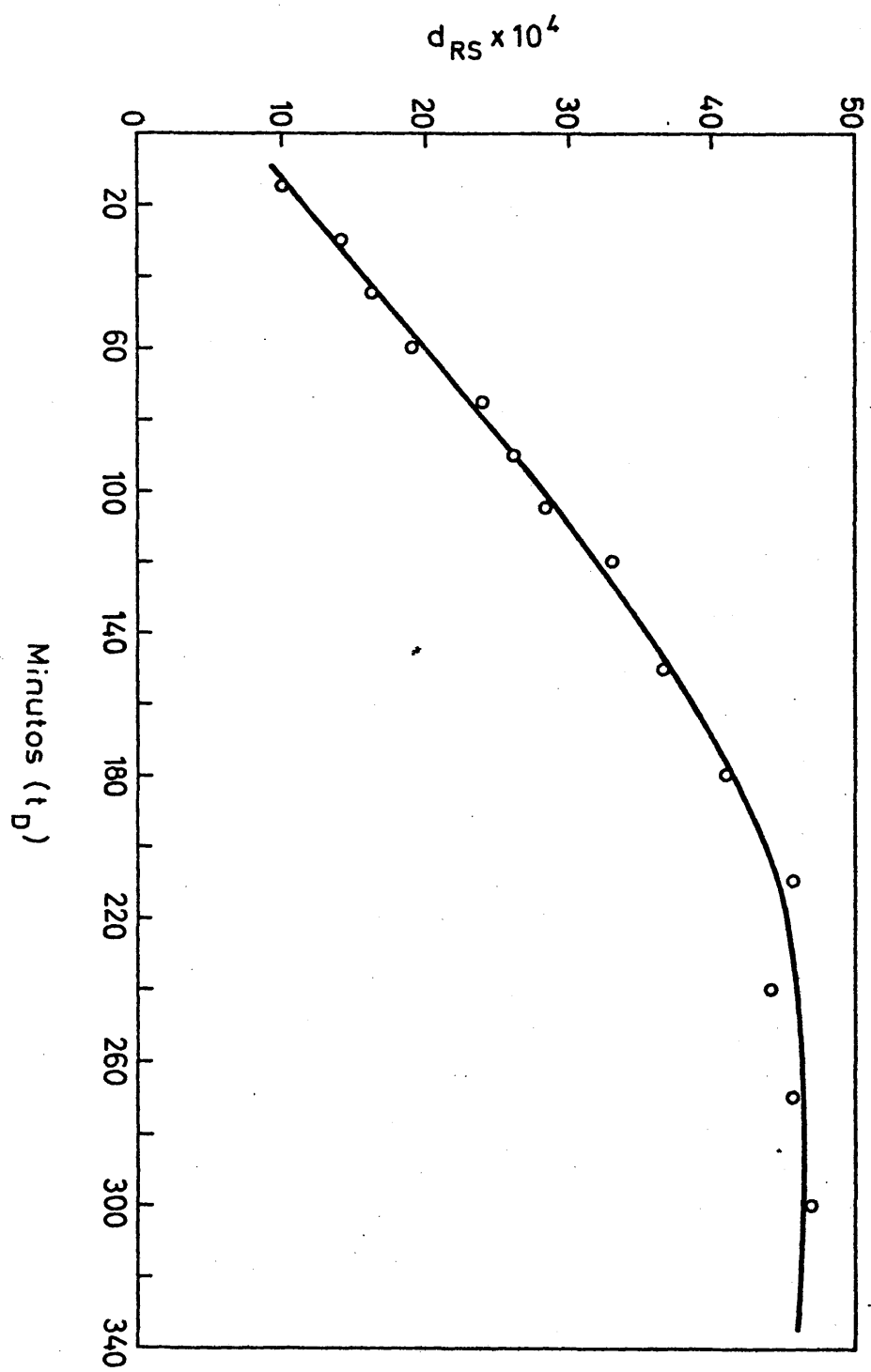
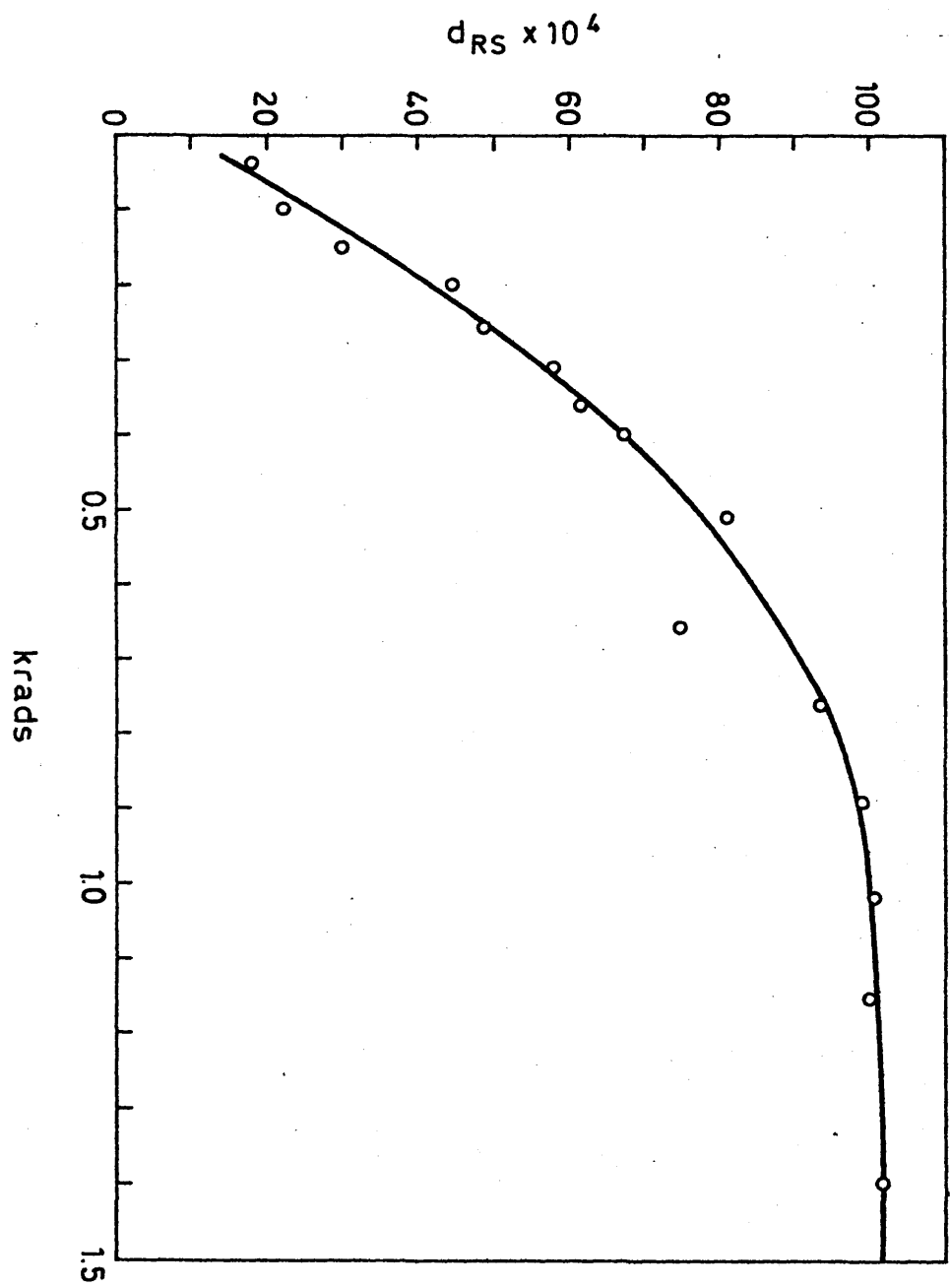


Figure 2





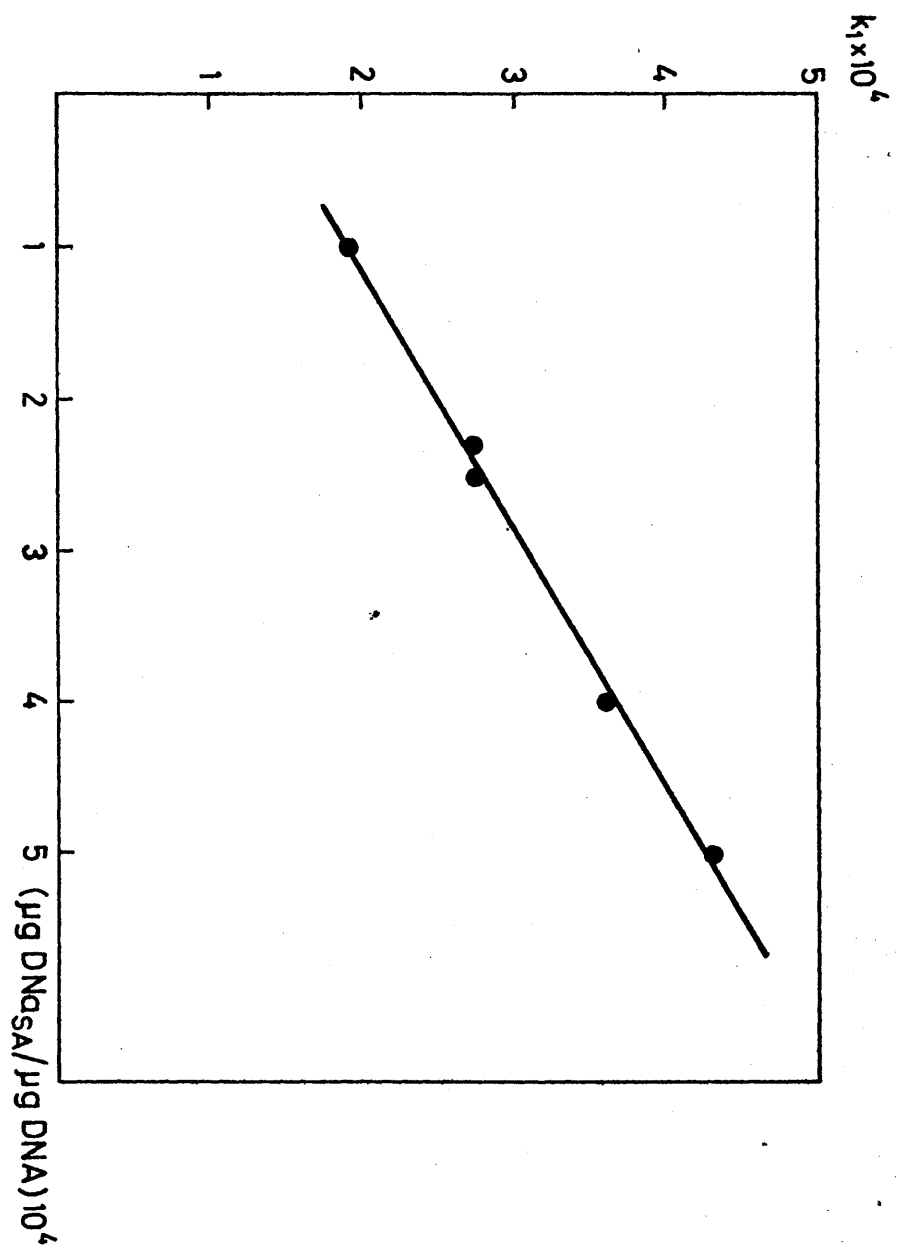


Figure 21

una misma relación $\frac{\mu\text{g DNasa}}{\mu\text{g DNA}}$.

La constante de probabilidad por unidad de dosis, k_2 , depende de las condiciones de irradiación. En nuestra experimentación nos hemos situado en condiciones fijas de intensidad de dosis, iones presentes, impurezas contaminantes, concentración, etc. En la figura 28 puede observarse la variación de k_2 con la concentración a que se irradia el DNA: la probabilidad por unidad de dosis es tanto menor cuanto mayor es la concentración de DNA, aunque la linealidad solo se produce para concentraciones no muy altas de DNA.

El ajuste realizado en el intervalo de proporcionalidad entre d_{RS} y tiempo de tratamiento, o entre d_{RS} y dosis aplicada, para las condiciones utilizadas en nuestra experimentación, da los siguientes valores para las constantes de proporcionalidad respectivas:

a) Degradación por tratamiento con DNasa:

$$k_1 = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ roturas simples/monómero, minuto.}$$

$$d_{RS}^o = 7,5 \cdot 10^{-4} \text{ roturas simples/monómero.}$$

b) Degradación por radiación gamma:

$$k_2 = 0,24 \cdot 10^{-4} \text{ roturas simples/monómero, Krad..}$$

$$d_{RS}^o = 9,6 \cdot 10^{-4} \text{ roturas simples/monómero.}$$

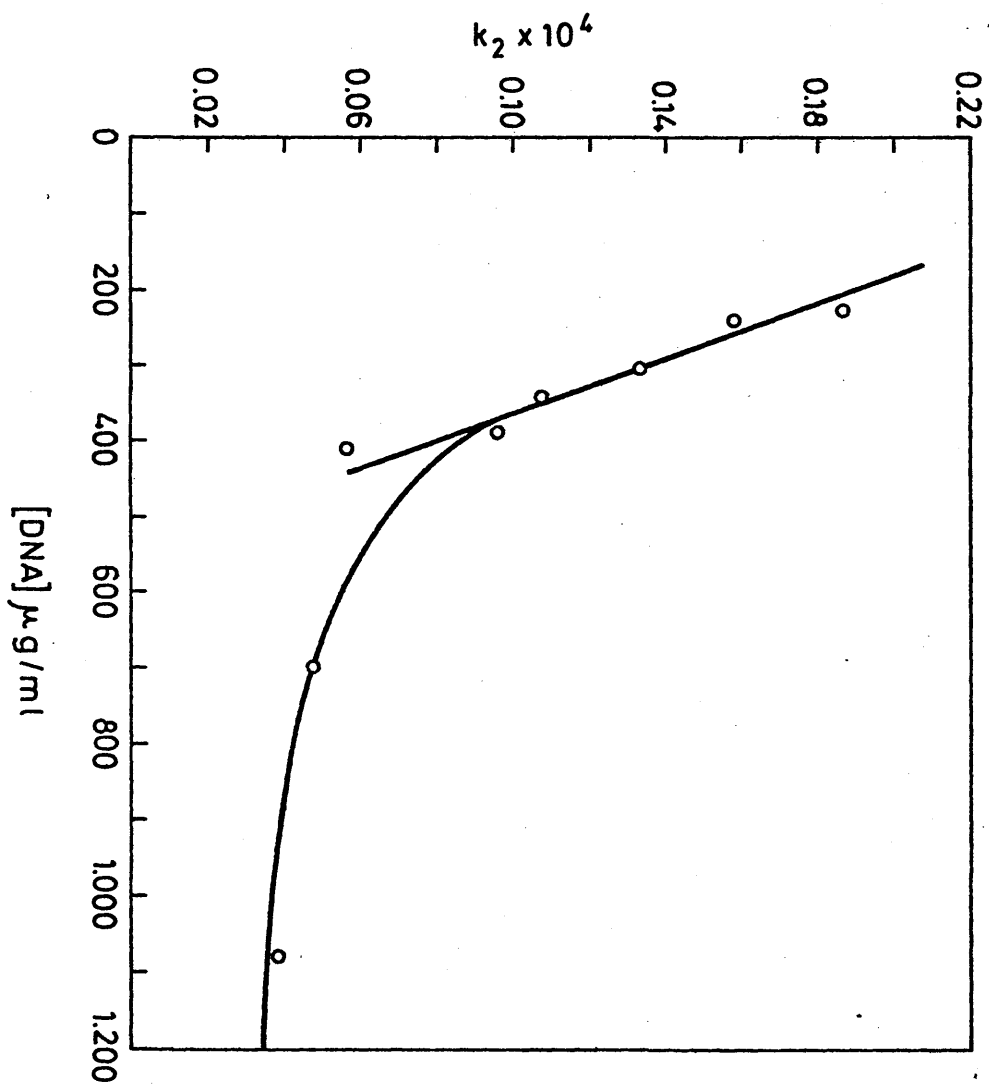


Figure 7

IV.2. FENOMENOLOGIA DE LA POLIMERIZACION.

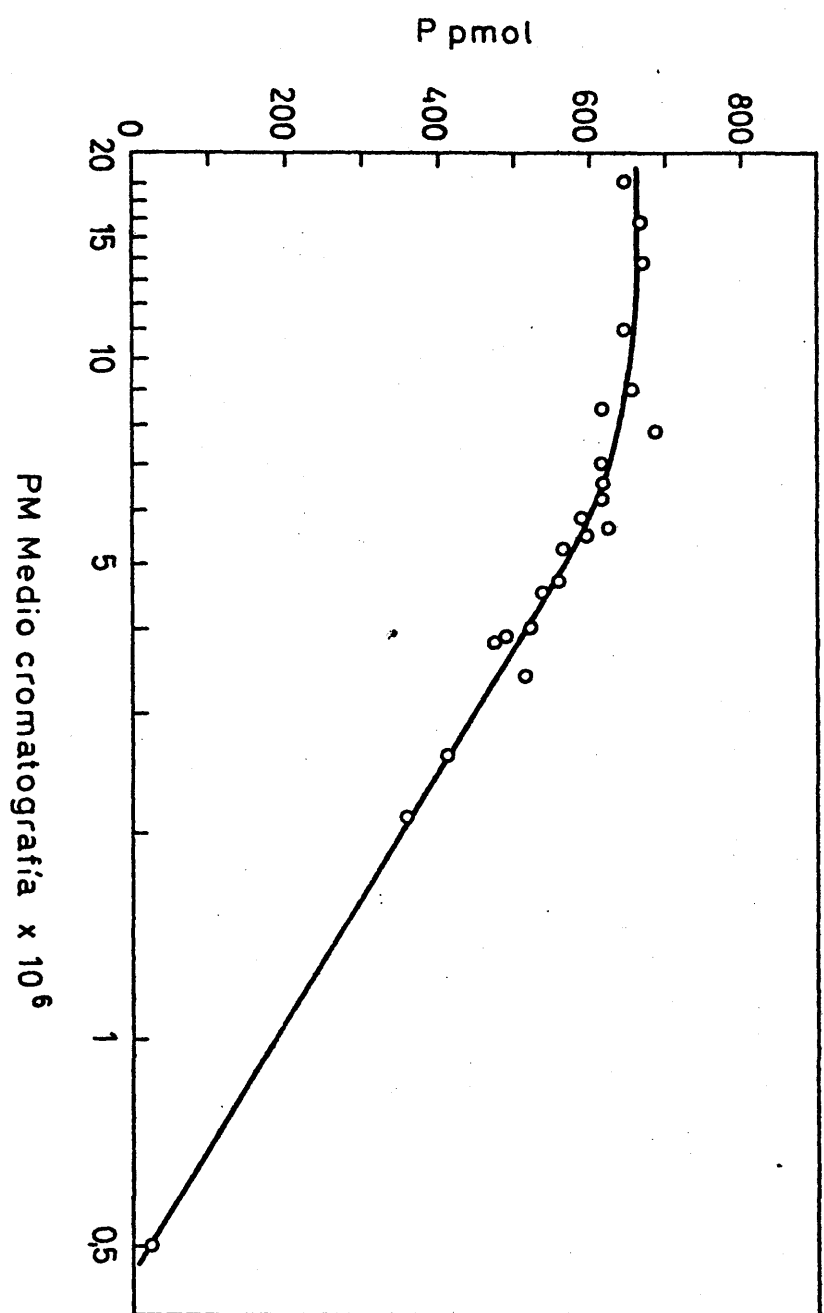
En nuestro intento de utilización de la DNA Polimerasa como instrumento que puede proporcionar información estructural a nivel local respecto a los grupos funcionales producidos en las roturas simples, teníamos que asegurarnos de que existe realmente dependencia entre la cantidad de polímero sintetizado en presencia de la enzima y algún parámetro macromolecular observable que de idea de la degradación de la muestra de DNA utilizada como molde.

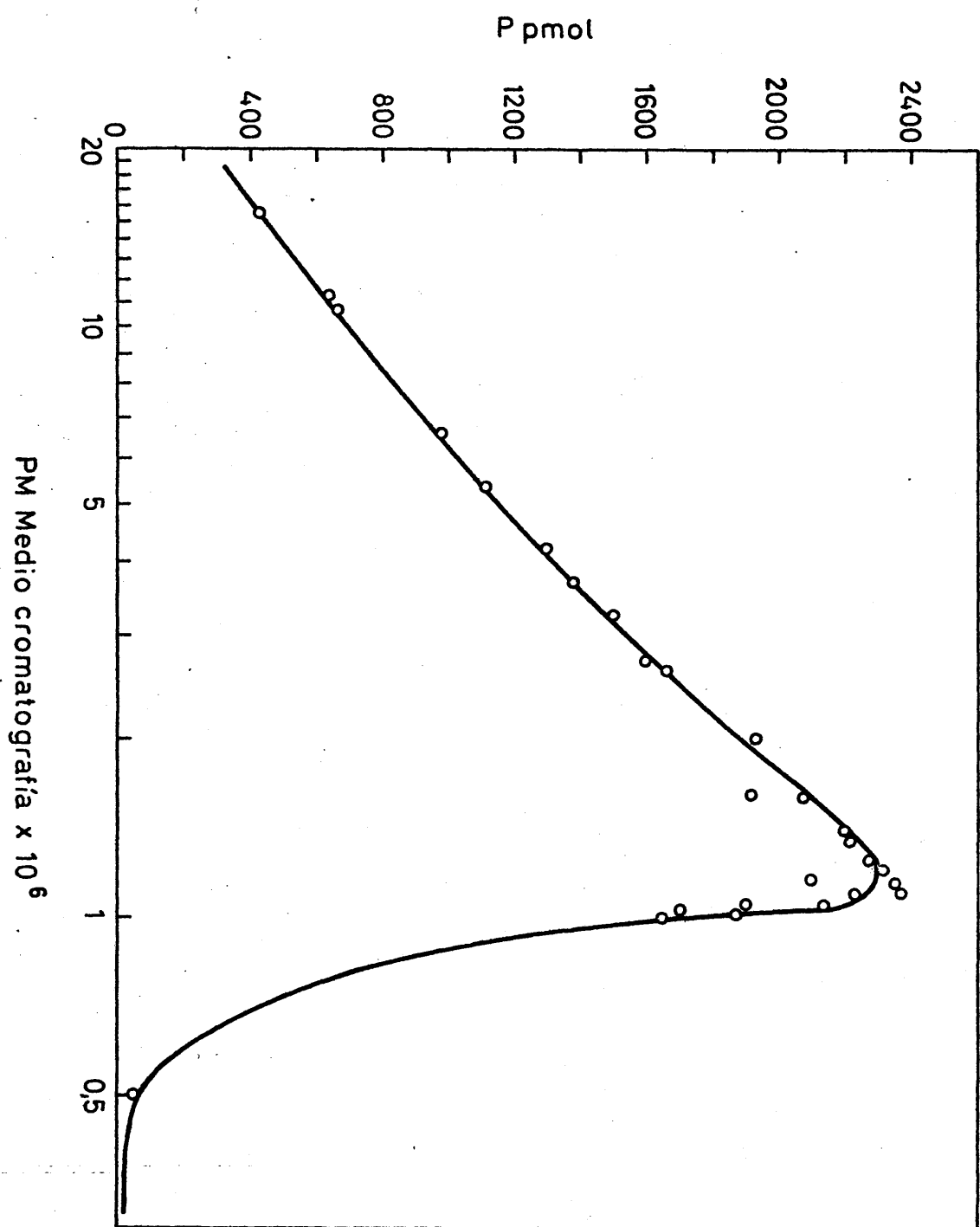
De nuestras propias observaciones y de las recogidas en la literatura concluimos que la cantidad de polímero sintetizado dependía del estado estructural del DNA utilizado como molde de la polimerización frente a la enzima.

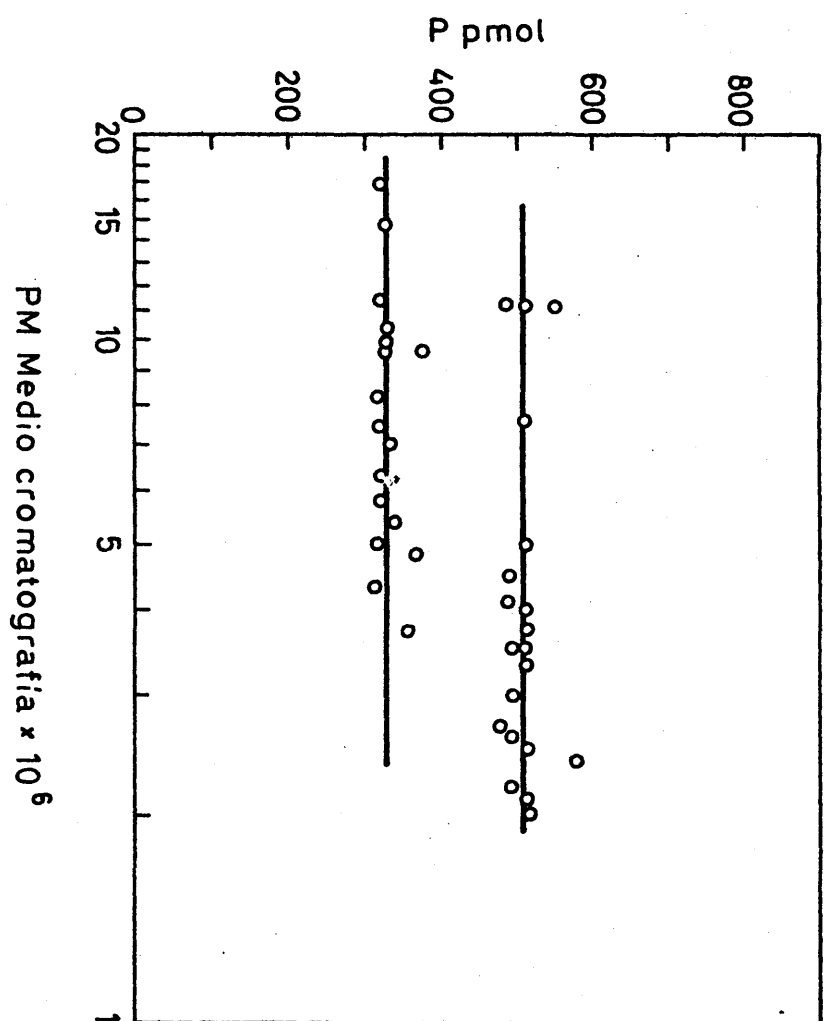
III.2.1. CRITICA DE LA DEPENDENCIA DE LA POLIMERIZACION CON EL PESO MOLECULAR.

En este sentido observamos la posible dependencia de la cantidad de polimerización con el peso molecular medio de la muestra utilizada como molde.

De la observación de las figuras 29, 30 y 31 podemos concluir que no hay una clara dependencia entre polimerización y peso molecular del DNA, puesto que esta depende del método de degradación utilizado. Incluso, podemos afirmar que esta dependencia se puede presentar o no según sea el mecanismo de degradación utilizado. Así, vemos que en el caso de degradación mecánica, figura 31, la polimerización es independiente del grado de degradación a que se haya sometido a la muestra de DNA molde y, en cambio, si existe dependencia cuando la degradación







actúa por la producción de roturas simples, como es el caso de la degradación enzimática, figura 30, y radiolítica, figura 29, aunque esa dependencia sea distinta en cada caso.

Como ambos mecanismos productores de roturas simples se diferencian solo en la estructura de los ex tr e m o s de cadena originados por la ruptura de enlace in ternucleotídico producida, si se comparan las curvas re presentadas en las figuras 29 y 30, se puede concluir que el tipo de alteración producida en el DNA molde influye diferenciadoramente en la cantidad de polimerización obtenida. Vemos en ellas que al utilizar como moldes DNAs con igual peso molecular medio pero degradados por distinto agente, la cantidad de polimerización obtenida es diferente. Si tenemos en cuenta que, según dijimos anteriormente, las cinéticas de degradación pa ra la radiolisis y la incubación con DNasa son equivalentes, de manera que dos muestras de DNA con igual pe so molecular medio degradadas por uno u otro método, tienen el mismo diagrama de elución, figura 20 y 21, concluimos que la polimerización viene influida por otro factor diferente del tamaño molecular, o, mejor, independientemente de la distribución de tamaños moleculares.

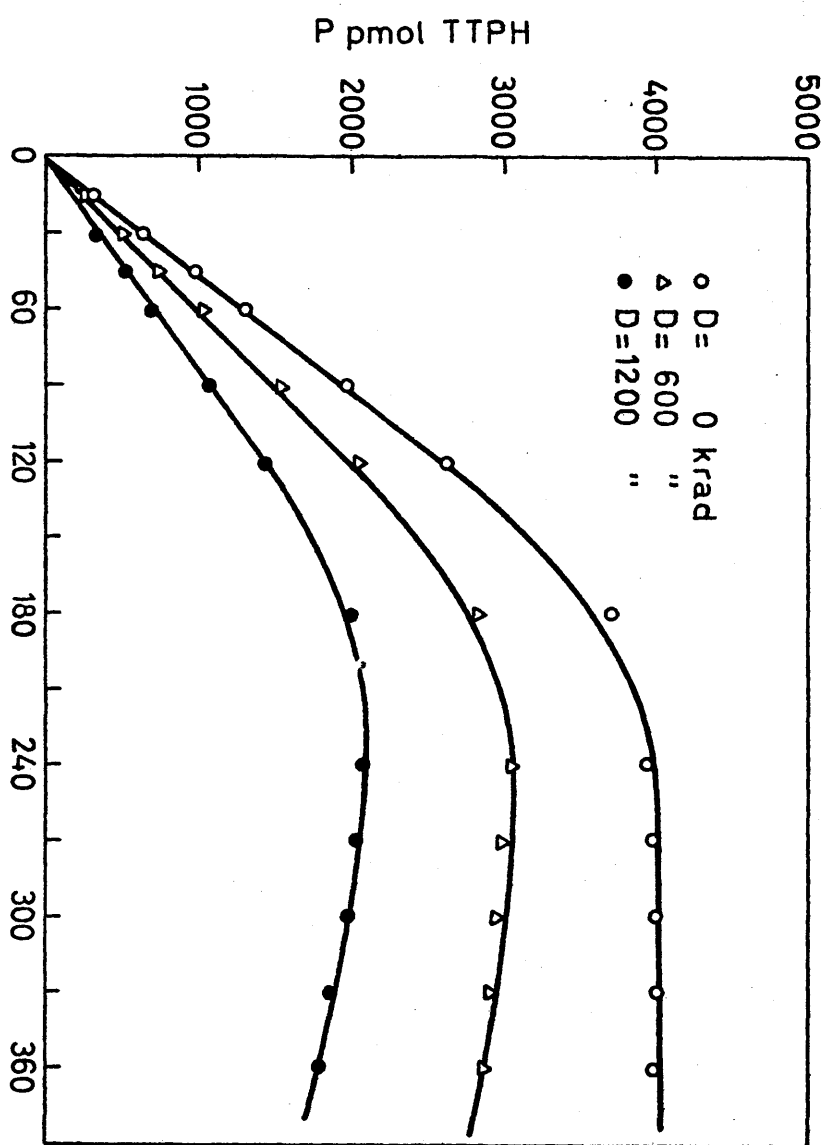
La existencia de ese factor independiente de la distribución de tamaños y que influye en la polime rización, se pone también de manifiesto al observar en la figura 31 la aparición de dos rectas paralelas originadas por la constancia de la polimerización cual quiera que sea la intensidad de la degradación me cá nica a la que se sometió al DNA molde; la recta de poli merización mayor se obtuvo produciendo una ligera degra dación enzimática previamente a la degradación me cá nica.

IV.2.2. ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE POLIMERIZACION.

El estudio de la variación de la cantidad de polímero sintetizado a lo largo del tiempo cuando se utilizan como moldes frente a la DNA Polimerasa muestras de DNA diferentemente degradadas aparece representado en las figuras 32, 33 y 34 para polimerizaciones con DNA molde degradado por radiación gamma, por incubación con DNasa y por tratamiento mecánico, respectivamente. En estas gráficas se puede observar que la cantidad de polímero sintetizado incrementa proporcionalmente con el tiempo de polimerización durante un intervalo que depende de la degradación a que se haya sometido al DNA molde, permaneciendo después constante o disminuyendo ligeramente dependiendo de la degradación experimentada por la muestra.

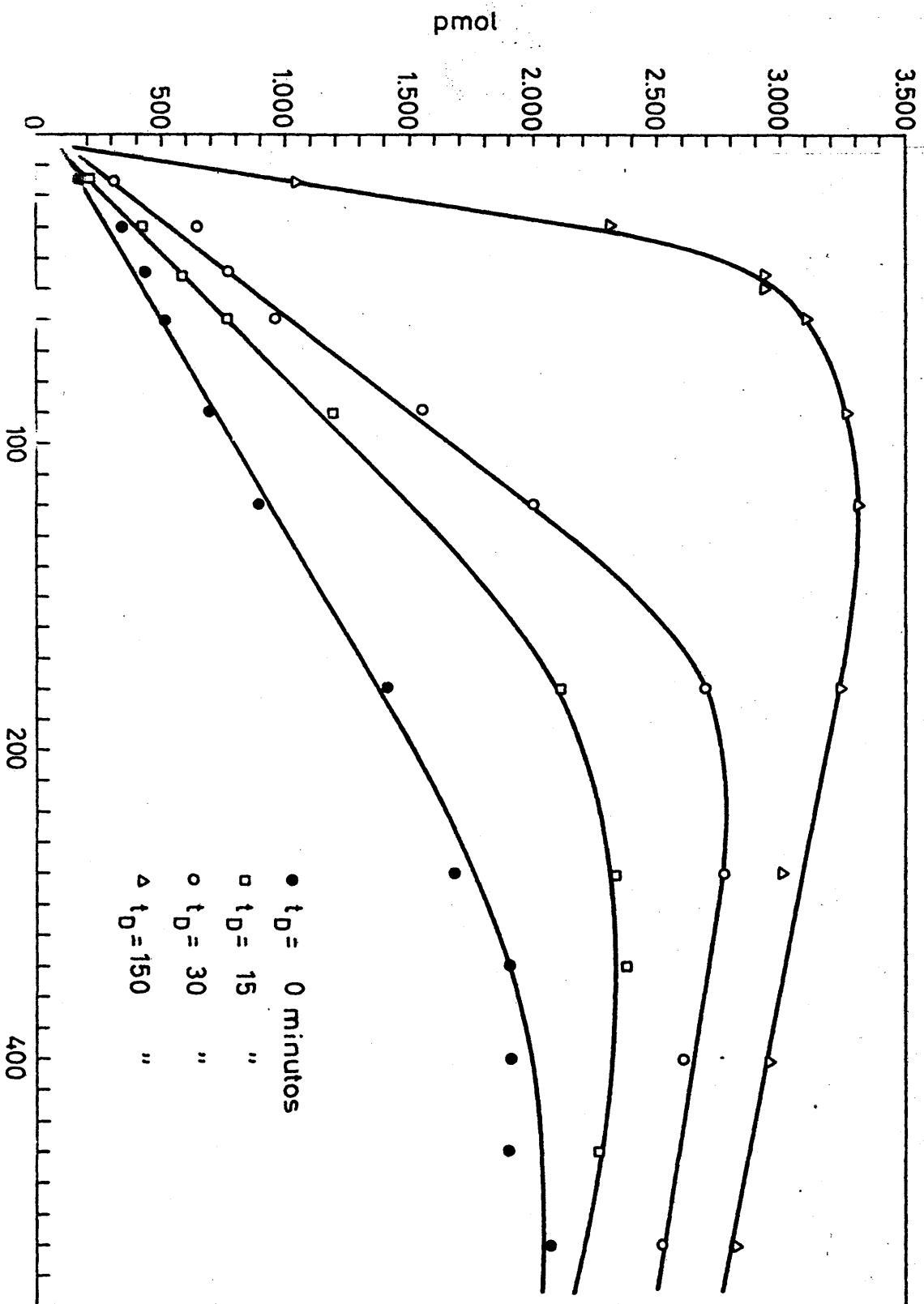
La cantidad de polímero sintetizado por unidad de tiempo, depende de las características estructurales del DNA molde, como se deduce de los distintos valores de pendiente inicial que adquieren las curvas según el tiempo de tratamiento degradativo al que se haya sometido al DNA utilizado como molde, y de la distinta evolución de los valores de las pendientes iniciales con el tiempo de tratamiento según el método de degradación utilizado.

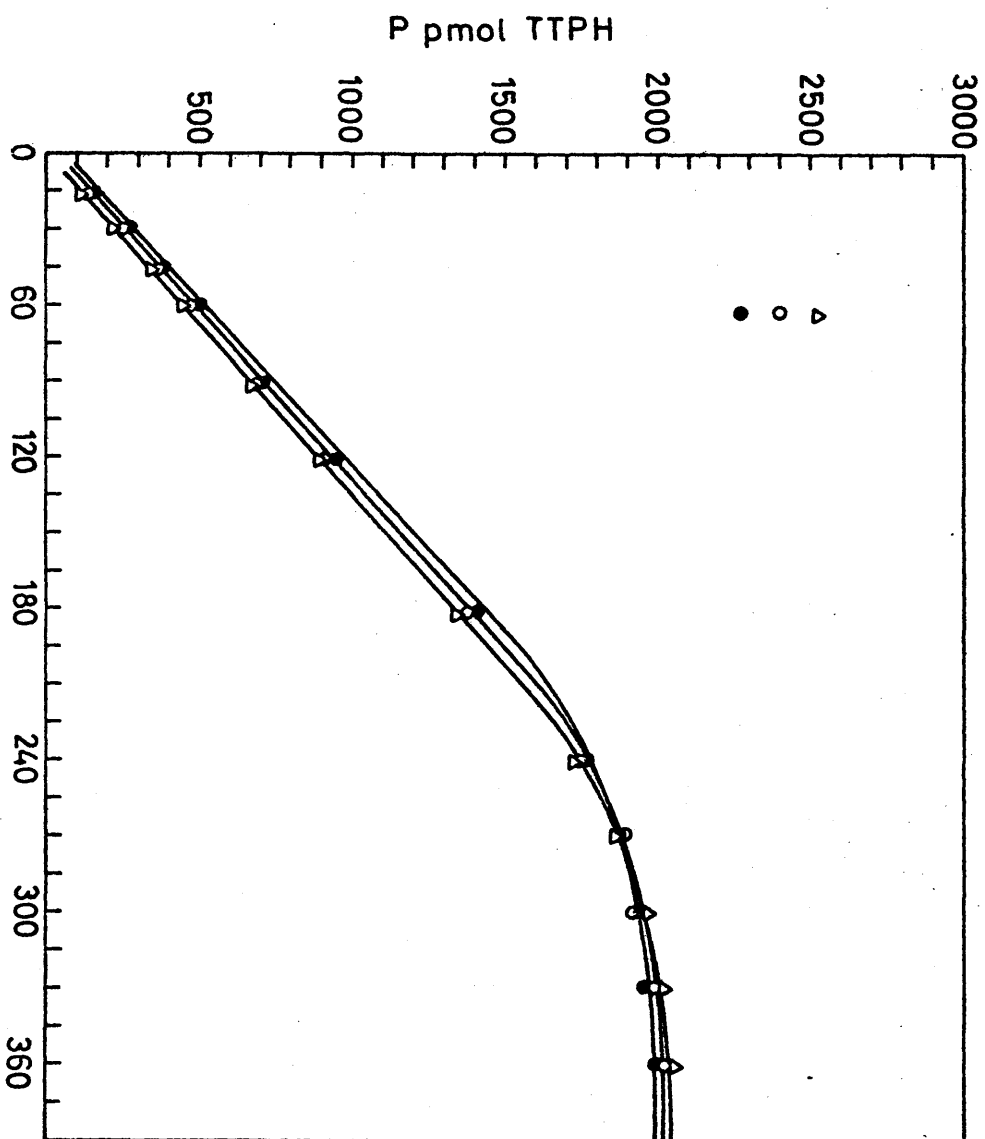
Cuando se representa la variación de la velocidad con el tiempo de polimerización, tal como aparece en la figura 35 para las polimerizaciones realizadas con DNA molde diferentemente degradados, se puede concluir la validez de la aproximación realizada al construir la expresión para la polimerización considerando constante la velocidad durante el período de 30 minutos utilizados en los ensayos de polimerización para los DNAs diferentemente degradados.



Minutos (tp)

Figura 32





Minutos (tp)
Figura 34

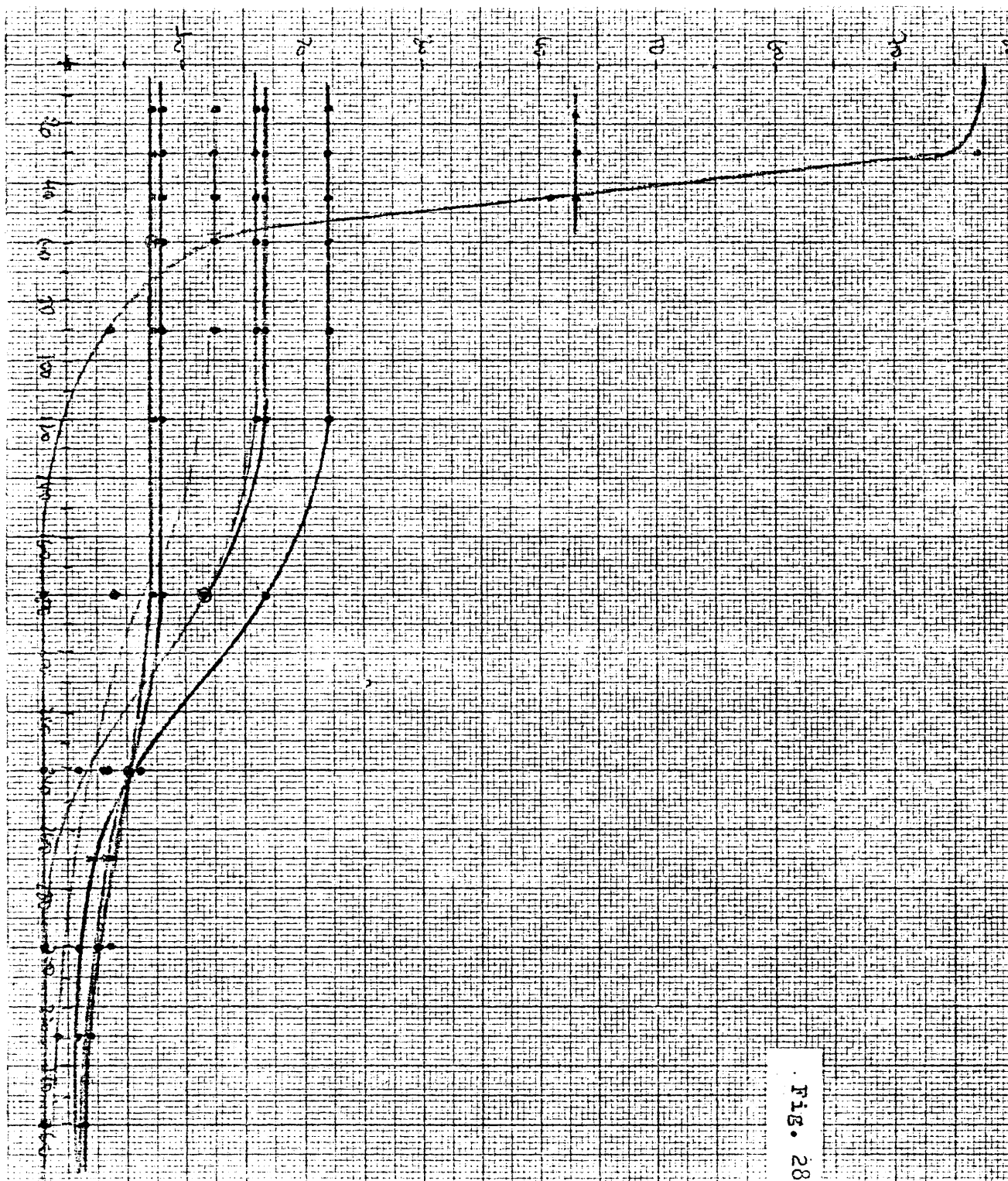


Figura 35

Tal como se dijo al dar la expresión para la velocidad de polimerización, la cantidad de polímero sintetizado por unidad de tiempo depende de las características estructurales del DNA molde, concretamente de la densidad de grupos (3')-OH existentes en el DNA formando parte de una rotura simple. Esta dependencia aparece reflejada en la figura 36, donde se observa una variación lineal de la velocidad de polimerización con la densidad de roturas simples con grupos (3')-OH de las distintas muestras de DNA utilizadas como moldes de la polimerización. Esto permite escribir una relación del tipo:

$$v_p = k \cdot d_{(3')OH} \quad (IV.1)$$

donde la constante de proporcionalidad, k, viene medida en nucleotidos sintetizados por nucleotidos totales de la muestra / unidad de tiempo y por nucleotido extremo con grupo (3')-OH.

El ajuste de los valores experimentales a una relación lineal de este tipo, da como valores de parámetros:

$$k = 22573 \text{ pmol T x pmol N /min. x pmol (3')OH}$$

$$\text{ordenada en el origen} = -3,4213$$

Para la representación anterior, los valores de v_p se han calculado a partir de las pendientes de las curvas de polimerización en los momentos iniciales de la cinética. Los valores de $d_{(3')OH}$ utilizados no son datos de determinación directa de densidad de roturas simples en las muestras de DNA utilizadas, sino que han sido calculados a partir de los datos de distribución de tamaños moleculares determinados en la muestra mediante cromato-

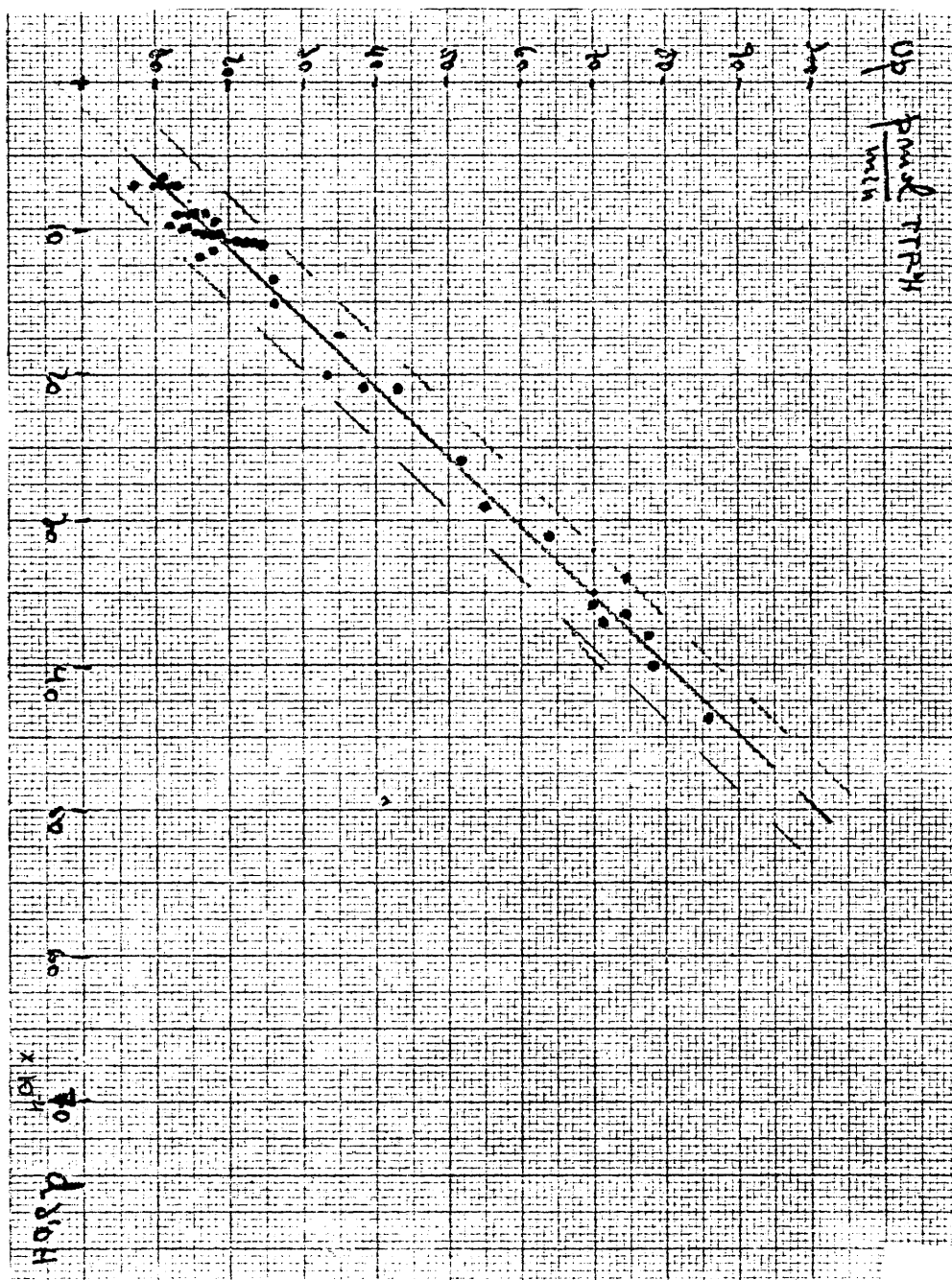


Figura 36

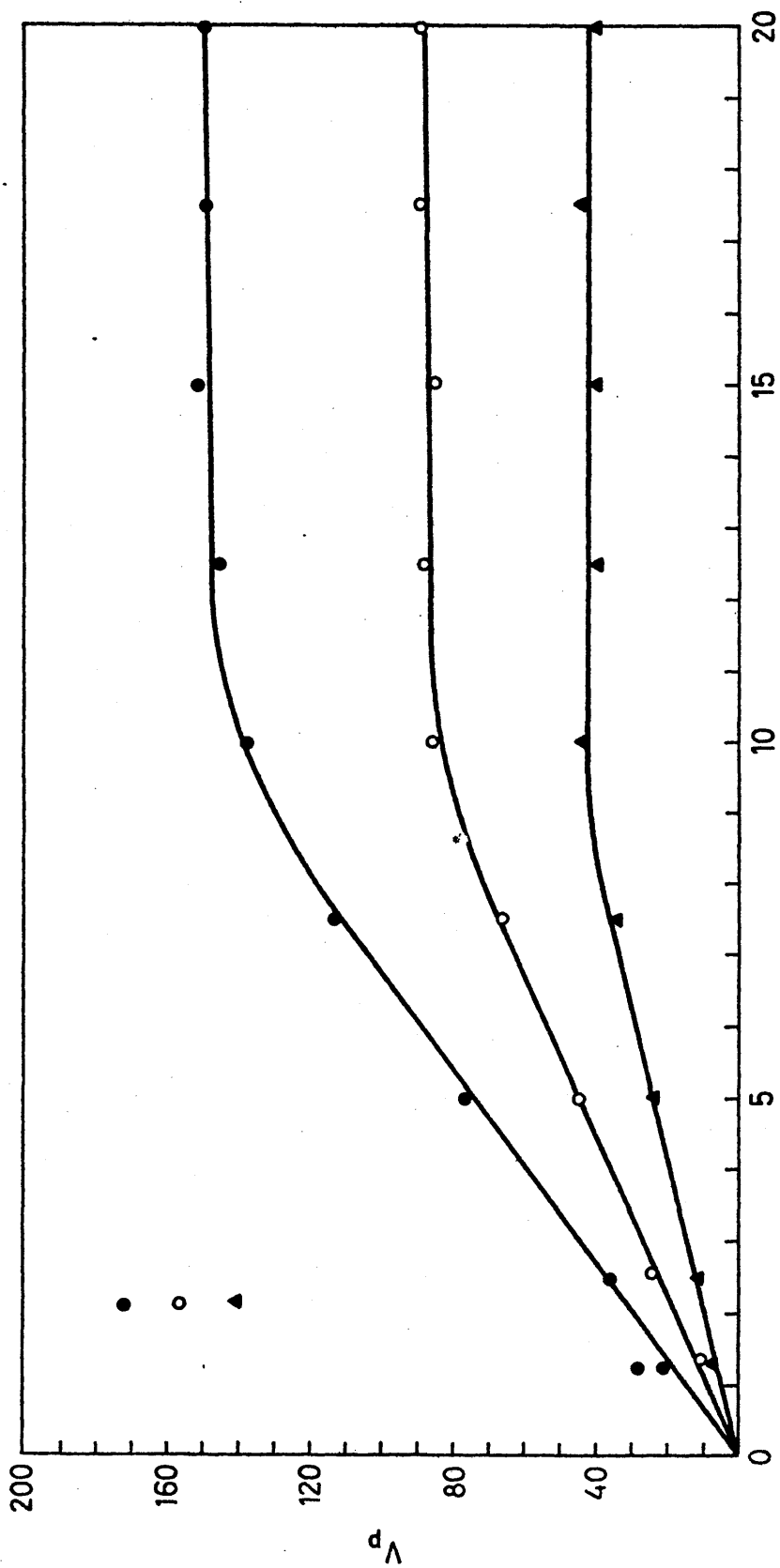
grafía en DEAE-celulosa, utilizando la expresión (III.5)

IV.2.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LOS REACTIVOS.

Otra dependencia de la velocidad a considerar es la que presenta con la concentración de la DNA Polimerasa. Se puede observar en la figura 37 que la velocidad varía al principio linealmente con la concentración de la enzima en la mezcla de polimerización, apareciendo luego constante para concentraciones mayores de la proteína. Se observa, además, que el tipo de variación es equivalente para las velocidades correspondientes a utilizar como mol de de las polimerizaciones muestras de DNA diferentemente degradadas.

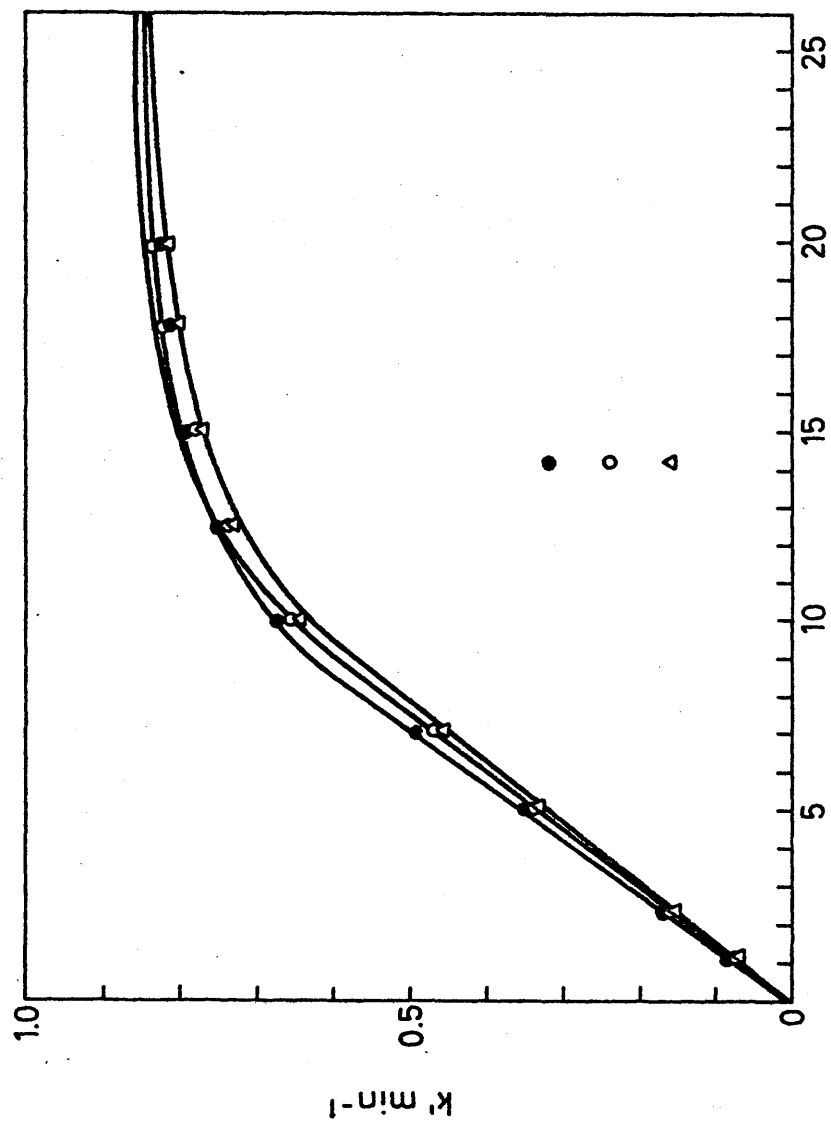
Esta dependencia con la concentración de DNA Polimerasa aparece acumulada dentro de la constante que relaciona la velocidad con la densidad de grupos (3')-OH, que posea la muestra de DNA, en la expresión (IV.1).

Esta afirmación queda confirmada por la gráfica presentada en la figura 38, donde se observa una variación de la k con la concentración de la proteína equivalente a la comentada anteriormente para la velocidad. En esa figura se observa también que el valor de esta constante de eficacia de polimerización por punto de iniciación existente en la muestra por nucleotido y por unidad de tiempo, se independiza de las características estructurales del DNA molde, puesto que presenta valores aproximadamente iguales para polimerizaciones con DNA molde muy diferentemente degradados por actuación de DNasa. Podemos, pues, concluir que nuestra suposición de reflejar las características estructurales del DNA molde en el parámetro de densidad de roturas simples con grupos (3')-OH es correcta.



$\mu\text{g/ml (polimerasa)}$

Figura 37



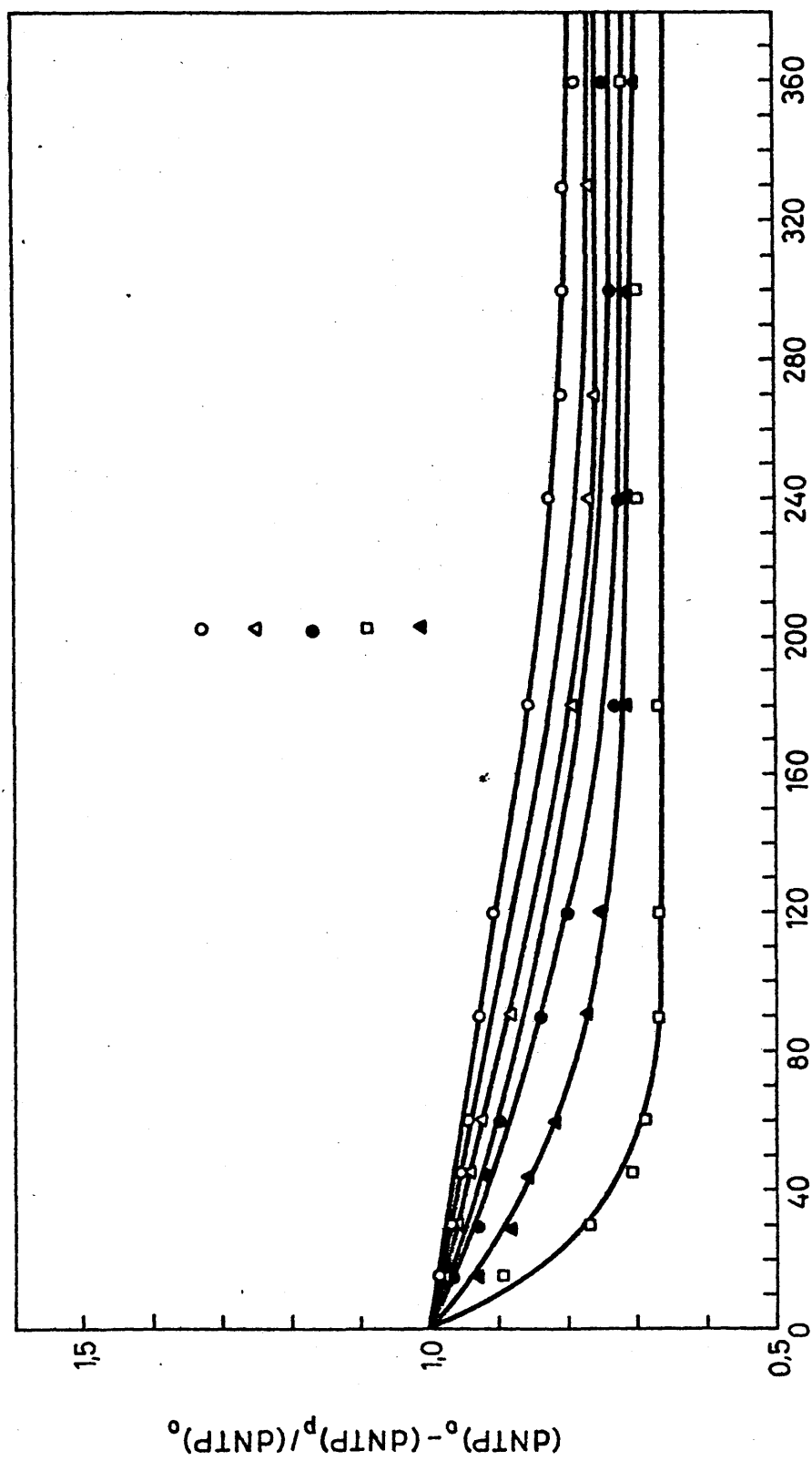
Proteina ($\mu\text{g/ml}$)

Figura 28

Otra consecuencia a concluir es que al fijar la concentración de DNA Polimerasa en la mezcla para la polimerización, como es el caso de nuestras experiencias con muestras de DNA diferentemente degradadas, el valor de esta constante de eficacia permanecerá inalterado. Además, como en nuestras condiciones experimentales nos hemos situado ampliamente por encima de la zona de dependencia con la concentración de enzima, nos hemos independizado de la influencia de cualquier fenómeno que origine incremento de puntos de unión DNA-enzima que no conduzcan a polimerización, como son, por ejemplo, la producción de grupos (3')-OH extremos de moléculas de DNA.

La velocidad de polimerización presenta dependencia también con la concentración de cada uno de los desoxirribonucleosidos trifosfato utilizados como precursores para la polimerización. Sin embargo, se han buscado las condiciones experimentales de manera que la concentración inicial puesta de cada uno de ellos represente un exceso grande frente a la concentración de los desoxinucleosidos trifosfato incorporados a la fracción polímero, para que la polimerización producida no afecte a la velocidad por disminución de la concentración de dNTP libres.

Si observamos la variación de la relación entre la concentración de dNTP libres en la mezcla incubante y la concentración inicial puesta en la mezcla, con el tiempo de polimerización, representada en la figura 39, se puede decir que el error cometido al considerar constante la concentración inicial de precursores durante los 30 minutos de incubación fijados para el test de polimerización es menor del 10%, para la mayoría de las muestras de DNA utilizadas y solamente del orden de 20% para el DNA mas degradado por DNasa. Para tiempos de polimerización mayores este error se incrementaría hasta



Minutos (tp)
Figura 39

oscilar entre un 20% y un 30% para las polimerizaciones realizadas con la mayoría de las muestras de DNA.

En las consideraciones expuestas en el capítulo II sobre la expresión para la velocidad y al estudiar su posible variación durante el tiempo de polimerización, se hizo una primera aproximación al considerar que el número de grupos $(3')\text{-OH}$, que posee la muestra de DNA después de la degradación a que haya sido sometida, no varía durante la polimerización. Debido a que no se pudo utilizar ningún método de medida directa de la densidad de roturas simples en los distintos momentos de la polimerización, no podemos dar ninguna prueba directa de la validez de esta aproximación realizada, pero la constancia de la v_p durante intervalos de tiempo superiores a 30 minutos, representada en la figura 35, y la clara dependencia de la v_p con $d_{(3')\text{OH}}$, expresada en la figura 36, pueden hacernos concluir la validez de esa aproximación realizada durante tiempos cortos de polimerización.

IV.3. COMPROBACION EXPERIMENTAL DE LAS EXPRESIONES DE POLIMERIZACION.

IV.3.1. POLIMERIZACION EN FUNCION DE $d_{(3')\text{OH}}$

Cuando se representa la cantidad de polímero sintetizado en función de la densidad de roturas simples con grupos $(3')\text{-OH}$ que presenta la muestra de DNA molde, aparece una variación lineal tanto cuando las muestras han sido degradadas por radiación gamma como cuando se degrada con DNasa o mecánicamente, como se puede observar en las figuras 40, 41 y 42, en comprobación con la expresión (II. 1) para el modelo de polimerización.

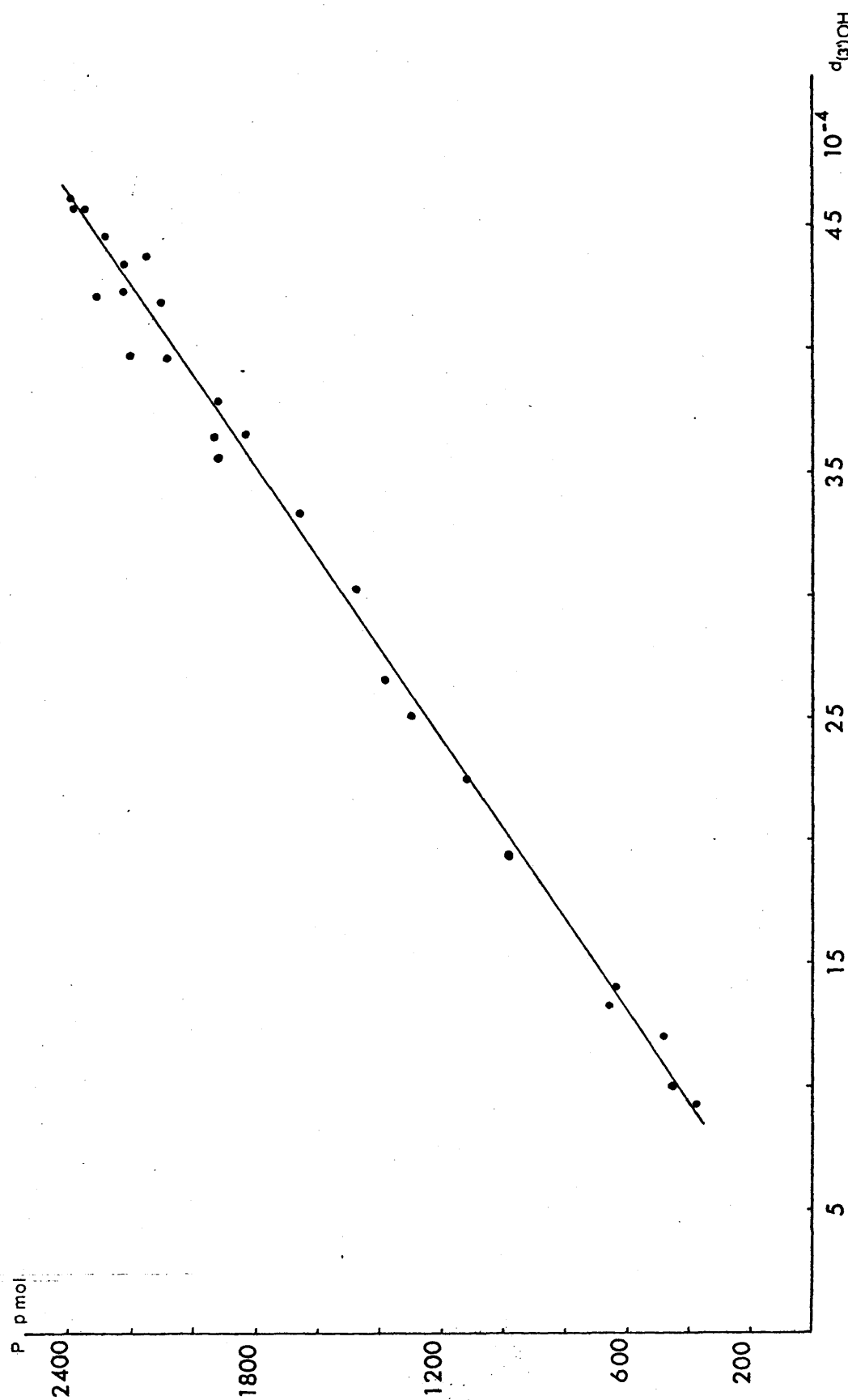


Figure 40

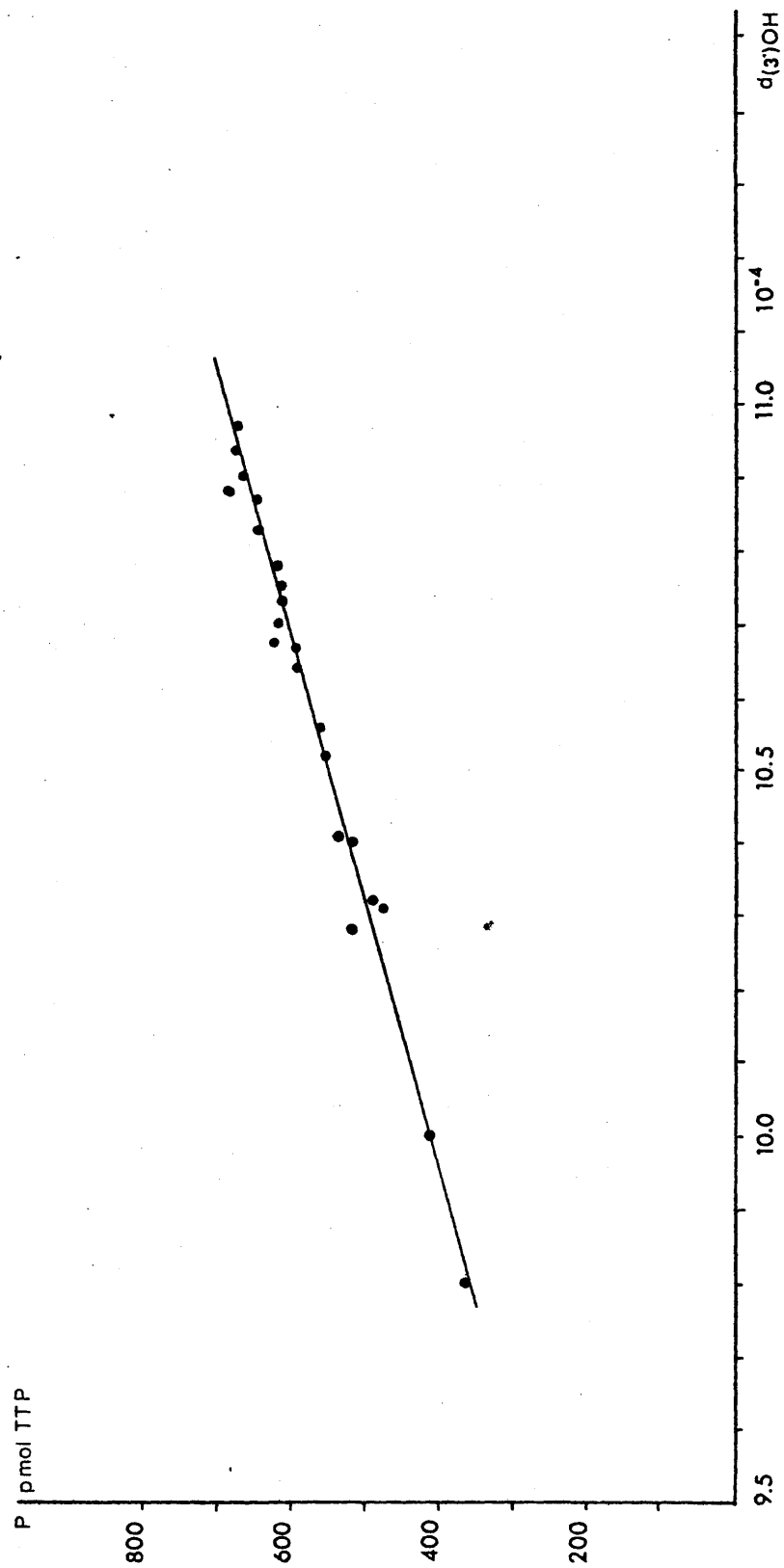


Figure 41

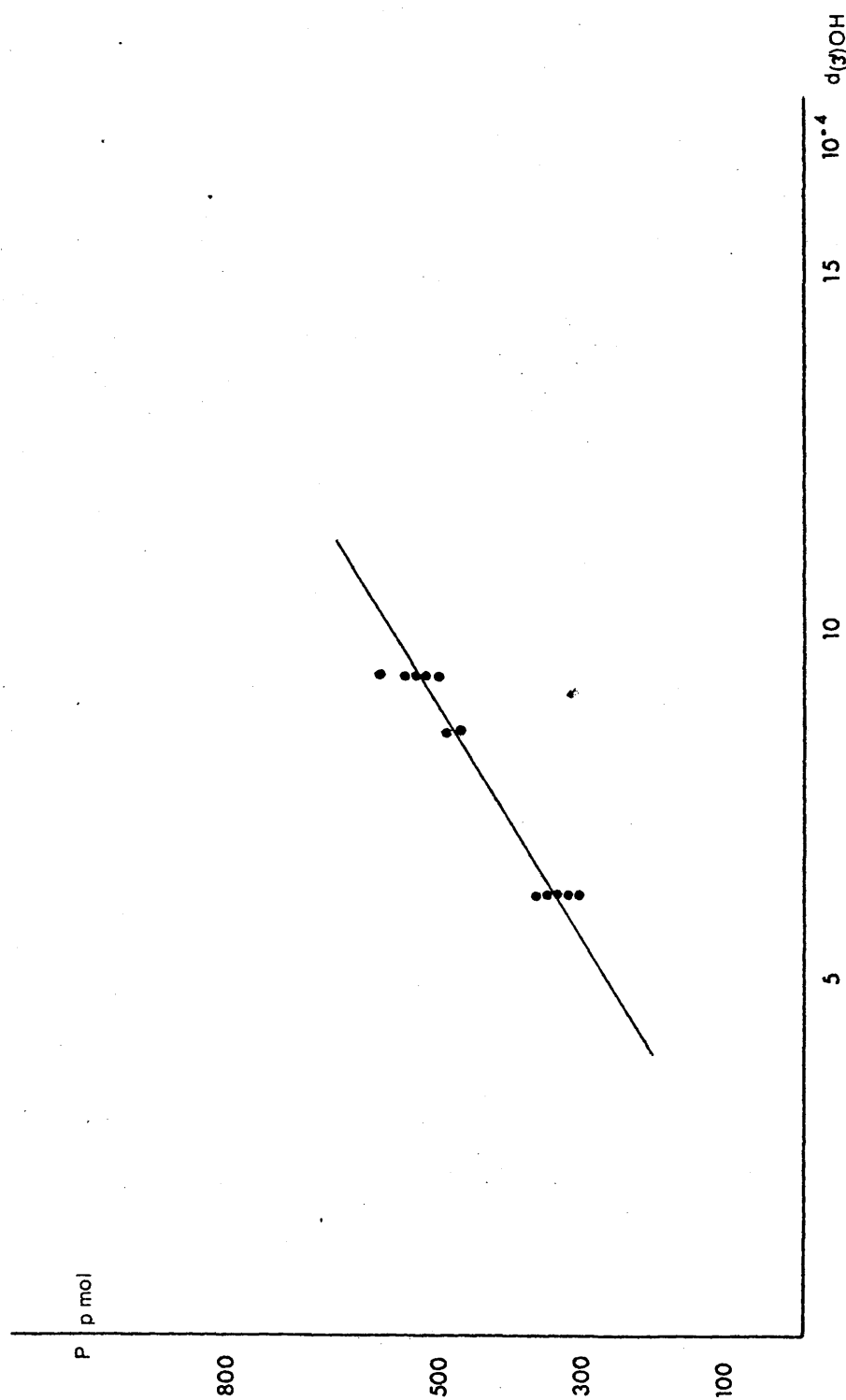


Figure 42

El ajuste de los valores experimentales de cantidad de polímero sintetizado frente a la densidad de roturas simples con grupos (3')-OH que presenta la muestra de DNA molde a una expresión lineal del tipo:

$$P = K' \cdot d_{(3')OH}$$

nos da, para cada método de degradación utilizado, los siguientes valores de los parámetros:

a) degradación del DNA molde por radiación gamma:

$$K' = 310,5 \cdot 10^4 \text{ pmol T} \times \text{pmol N} / \text{pmol (3')OH}$$

Las unidades para K' son: picomol de nucleotido incorporado a la fracción polímero por picomol de nucleotido en la muestra de DNA / picomol de nucleotido de la muestra de DNA que poseen grupos (3')-OH libres en las condiciones experimentales fijadas, y que se pueden esquematizar por pmol T x pmol N / pmol (3')OH...

b) degradación del DNA molde por incubación con DNasa:

$$K' = 72,7 \cdot 10^4 \text{ pmol T} \times \text{pmol N} / \text{pmol (3')OH}$$

c) degradación mecánica del DNA molde:

$$K' = 79,3 \cdot 10^4 \text{ pmol T} \times \text{pmol N} / \text{pmol (3')OH}$$

La constante K' puede ser relacionada con la constante K que aparece en la expresión (II. 1) a través de:

$$K' = K \cdot N$$

donde N es el número de nucleotidos totales de la mues-

tra de DNA molde.

La constante K' se ajusta a valores muy próximos para las polimerizaciones realizadas en presencia de DNA moldes degradados por DNasa y mecánicamente. En cambio, cuando en las polimerizaciones se utilizan como moldes muestras de DNA degradadas radiolíticamente, el valor ajustado para K' resulta mucho mayor que el obtenido en los otros ajustes.

Este valor incrementado de K' para muestras degradadas por radiolisis es atribuible a una subestimación de la variación de $d_{(3')OH}$, debida al proceso de degradación para esas muestras, en su determinación a partir de los datos de fraccionamiento cromatográfico a través de la expresión (III. 5).

Como según hemos supuesto, durante el proceso de degradación radiolítica no hay creación de nuevos grupos extremos $(3')-OH$ sino eliminación de los preexistentes en la muestra anteriormente a la degradación radiolítica, en realidad y debido a falta de sensibilidad del método de fraccionamiento cromatográfico, se está subestimando la disminución de $d_{(3')OH}$ en las muestras irradiadas.

El método de fraccionamiento cromatográfico no es capaz de detectar zonas de hélice sencilla en el interior de la doble cadena, lo que podríamos denominar "boquetes" dentro de la estructura bihelicoidal, por tanto, no tiene en cuenta aquellos extremos $(3')-OH$, perdidos como útiles para la polimerización, que son eliminados al producirse una rotura simple radiolítica en la misma cadena y a una distancia que permite la desestabilización del fragmento de cadena comprendido entre ellas. Igualmente no son considerados aquellos

extremos (3')-OH perdidos como útiles para la polimerización por alteración del nucleótido terminal que posee el grupo (3')-OH por reacción con el radical $\text{OH}\cdot$, o aquellas alteraciones radiolíticas que, aunque no conduzcan a ruptura de enlace internucleotídico, impiden la polimerización desde un extremo (3')-OH, como son, por ejemplo, la alteración de bases de la cadena complementaria y próximas a un grupo (3')-OH extremo.

En la expresión para la polimerización en función de $d_{(3')\text{OH}}(t)$ se tienen en cuenta estos términos en el desarrollo de $d_{(3')\text{OH}}(t)$, por lo que al expresar la d_{RS} a través de las expresiones (III.8) y (III.9), sin utilizar los datos de fraccionamiento cromatográfico, se consigue, como veremos en la sección siguiente, un perfecto ajuste de la expresión de polimerización a los datos experimentales para todos los métodos de degradación utilizados.

Se puede observar en la figura 43 que cuando se representa el valor de la polimerización frente a la $d_{(3')\text{OH}}$ de la muestra de DNA molde para todas las polimerizaciones realizadas, cualquiera que sea el método de degradación al que se le hay sometido, todos los puntos pueden ser ajustables a una única recta. Se observa en esta figura que los puntos correspondientes a pruebas de polimerización realizadas con muestras de DNA irradiadas se acumulan en un intervalo muy pequeño en comparación con los intervalos en los que se mueven los puntos correspondientes a polimerizaciones realizadas con muestras de DNA tratadas con DNasa o degradadas mecánicamente, presentando una linealidad distinta entre sí.

Del ajuste realizado sobre los datos de esta última gráfica se obtiene como valor de los parámetros:

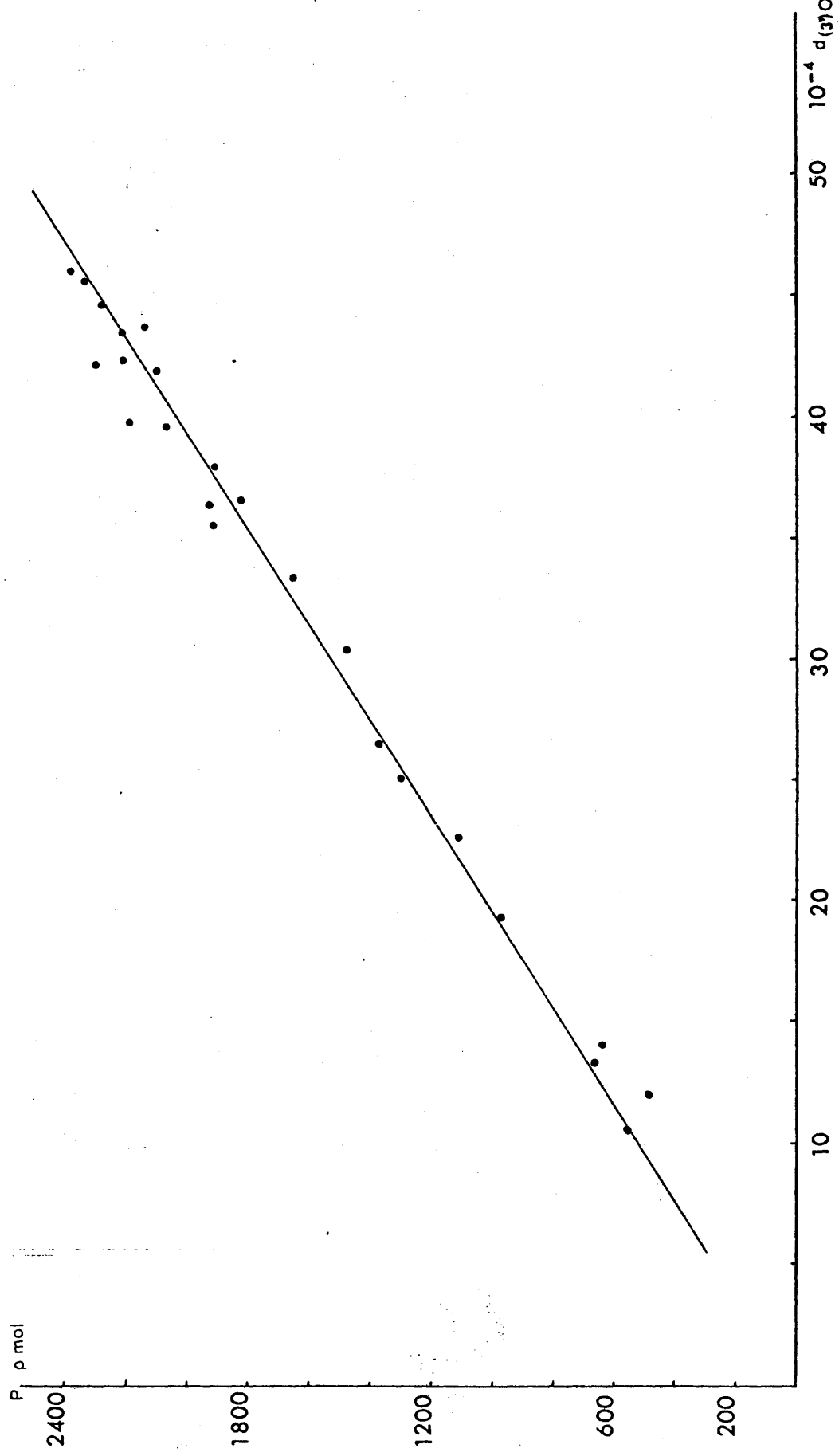


Figure 43

$$K' = 77,8 \cdot 10^4 \text{ pmol T} \times \text{pmol N} / \text{pmol (3')OH}$$

Se observa que el valor así obtenido para K' es bastante próximo al que se encontró en los ajustes para polimerizaciones con molde degradado por DNasa y mecánicamente, por separado.

Según esto, la eficacia de la polimerización por punto de iniciación que presenta la muestra utilizada como molde sería la misma para todas las polimerizaciones realizadas, independientemente del método empleado para degradar la muestra.

Dicho de otro modo, nuestra suposición de tomar la variable densidad de grupos (3')-OH, existentes en la muestra de DNA formando parte de roturas simples, como la responsable de las diferencias de cantidad de polimerización obtenida según el método de degradar al DNA, cuando se utilizan como molde muestras con igual peso molecular medio e idéntica distribución de tamaños moleculares, es válida puesto que, para cualquier método de degradación utilizado para alterar la muestra molde, la cantidad de polimerización parece depender linealmente de $d_{(3')OH}$ e independizarse en cambio del método de alteración, ya que la constante de proporcionalidad no varía con el método de degradación.

Si bien esta última afirmación no aparece demasiado válida con los resultados presentados hasta aquí, por la salvedad que habría que hacer cuando la muestra fuese degradada por radiolisis, quedará completamente confirmada en el siguiente apartado, cuando se realiza el cálculo de d_{RS} independientemente de los datos de fraccionamiento cromatográfico que pueden inducir a error por la falta de sensibilidad comentada.

IV.3.2. POLIMERIZACION EN FUNCION DE LA EXTENSION DEL TRATAMIENTO.

Se ha realizado el ajuste de los valores experimentales obtenidos en este trabajo a la expresión (II.10), obtenida, para la cantidad de polimerización, en cada uno de los métodos de degradación de DNA utilizados. Los resultados obtenidos son los siguientes.

IV.3.2.1. DNA degradado por radiación gamma.

Cuando se somete a la prueba de polimerización una muestra de DNA que ha sido degradada por radiación gamma, la cantidad de polímero sintetizado varía linealmente con la dosis a que ha sido sometida la muestra, como puede verse en la figura 44. Estos resultados están de acuerdo con la expresión (III.13), obtenida al simplificar en la expresión (II.10) al tener en cuenta el valor de las variables cuando la degradación es por radiación gamma.

El ajuste a las expresiones teóricas dadas de los valores experimentales de polimerización obtenidos se realizó mediante un programa de ajuste confeccionado utilizando "un programa para hallar mínimos locales de funciones generales de muchas variables usando direcciones conjugadas", denominado "MINCON", de la librería de programas del CERN⁽³²⁶⁾. Hemos utilizado la versión de "MINCON", adaptada por el grupo de "Altas Energías" de la JEN, a la calculadora IBM 7090 del Centro de Cálculo de la Universidad de Madrid.

El programa utilizado ajusta los valores experimentales a la expresión teórica dada, confeccionando la función χ^2 , expresada en función de los parámetros,

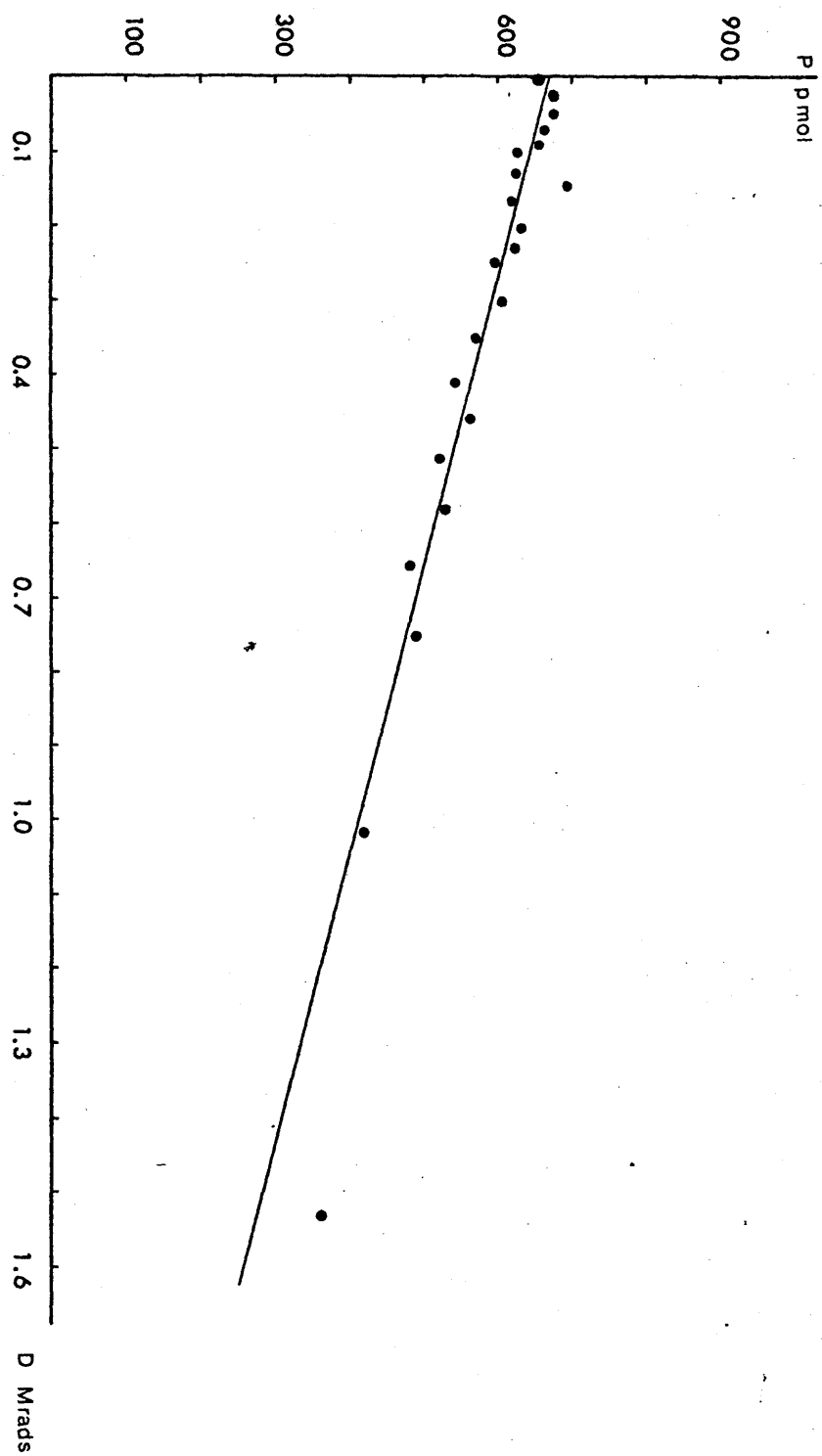


Figure 44

a los que deja como variables para la búsqueda de los mínimos de la función χ^2 . Da, por tanto, los valores de los parámetros que minimizan la función χ^2 para unos valores de partida. Con reiteradas pasadas del programa para distintos valores de partida para los parámetros, se localiza el conjunto de valores de ellos que dan un mínimo más bajo para la función χ^2 .

Utilizando este programa de ajuste para los valores experimentales de polimerización en función de la dosis a la expresión lineal (III.13) se consiguen los siguientes valores para los parámetros:

$$K = 20.6 \text{ pmol } T / \text{pmol } (3')OH'$$

$$d_{(3')OH}^o = 7,7 \cdot 10^{-4} \text{ pmol } (3')OH / \text{pmol } N$$

$$h_{(3')OH} = 2$$

$$h_R = 7$$

$$k_2 = 0,34 \cdot 10^{-4} \text{ pmol } R / \text{pmol } N \times \text{Krad}$$

En el ajuste realizado, el valor que adquiriría la función χ^2 para esos valores de los parámetros era 20,1 siendo el número de grados de libertad 19.

IV.3.2.2. DNA degradado por tratamiento con DNasa.

Cuando se somete a la prueba de polimerización una muestra de DNA que ha sido degradada por tratamiento con DNasa, los valores experimentales obtenidos para la cantidad de polímero sintetizado varían según una parábola en función del tiempo de tratamiento a que ha sido sometida la muestra, como puede verse en la gráfica

de la figura 45. Este resultado está de acuerdo con la expresión (III.11), obtenida por simplificación de la (II.10), donde se establecía una variación cuadrática de la polimerización obtenida con el tiempo de tratamiento previo de la muestra.

El ajuste de los valores experimentales de polimerización en función del tiempo de incubación con DNasa a la expresión (III.11), utilizando el programa de ajuste descrito anteriormente, conduce a los siguientes valores de los parámetros:

$$K = 19,6 \text{ pmol T / pmol (3')OH}$$

$$d_{(3')\text{OH}}^0 = 5,73 \cdot 10^{-4} \text{ pmol (3')OH / pmol N}$$

$$k_1 = 2,1 \cdot 10^{-4} \text{ pmol (3')OH / pmol N x min.}$$

$$h_{(3')\text{OH}} = 2$$

En este ajuste, el valor hasta el que se minimiza la función χ^2 , para el conjunto de valores listado para los parámetros, era 21,9 siendo el valor más bajo encontrado para todos los conjuntos de valores de los parámetros que minimizaban la función χ^2 . El número de grados de libertad era, en este caso, 17.

IV.3.2.3. DNA degradado mecánicamente.

Cuando se somete a la prueba de polimerización una muestra de DNA que ha sido degradada por tratamiento mecánico, utilizando agitaciones a alta velocidad de la solución de la muestra, los valores experimentales obtenidos para la cantidad de polimerización sintetizado permanece independiente de la intensidad del tratamiento

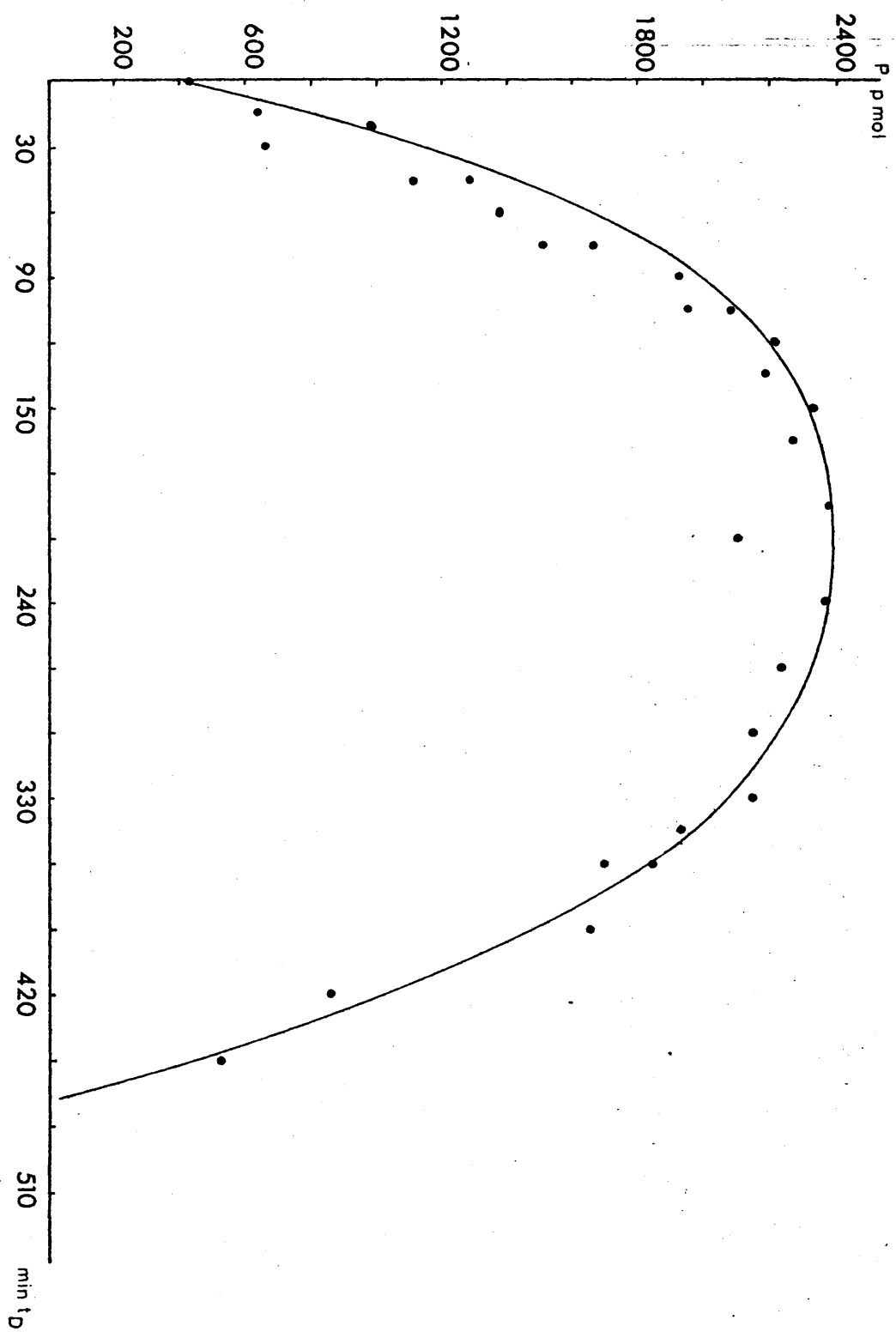


Figure 45

aplicado sobre la muestra molde para degradarla, como puede verse en la gráfica de la figura 46, donde se representa la cantidad de polímero sintetizado frente al parámetro v.t, indicador de la extensión del tratamiento aplicado sobre la muestra. En dicha figura aparecen dos rectas paralelas obtenidas al someter a degradación mecánica muestras diferentemente alteradas, por tratamiento previo con DNasa de una de ellas, la que presenta polimerizaciones más altas. Este resultado está de acuerdo con la expresión (III.15) donde se expresaba la cantidad de polímero sintetizado como únicamente función de la densidad de roturas simples iniciales con grupo (3')-OH, resultando independiente de la extensión del tratamiento degradativo mecánico realizado.

El ajuste de los valores experimentales de polimerización correspondientes a la muestra que conduce a más baja polimerización, da los siguientes valores para los parámetros:

$$K = 18,7 \text{ pmol T} / \text{pmol (3')OH}$$

$$d_{(3')OH}^o = 5,6 \cdot 10^{-4} \text{ pmol (3')OH} / \text{pmol N}$$

$$h_{(3')OH} = 2$$

Cuando se realiza el ajuste de los valores experimentales de polimerización para las muestras que conducen a una polimerización mas alta, los valores de los parámetros ajustables de la expresión (III.15) son los siguientes:

$$K = 19,2 \text{ pmol T} / \text{pmol (3')OH}$$

$$d_{(3')OH}^o = 7,7 \cdot 10^{-4} \text{ pmol (3')OH} / \text{pmol N}$$

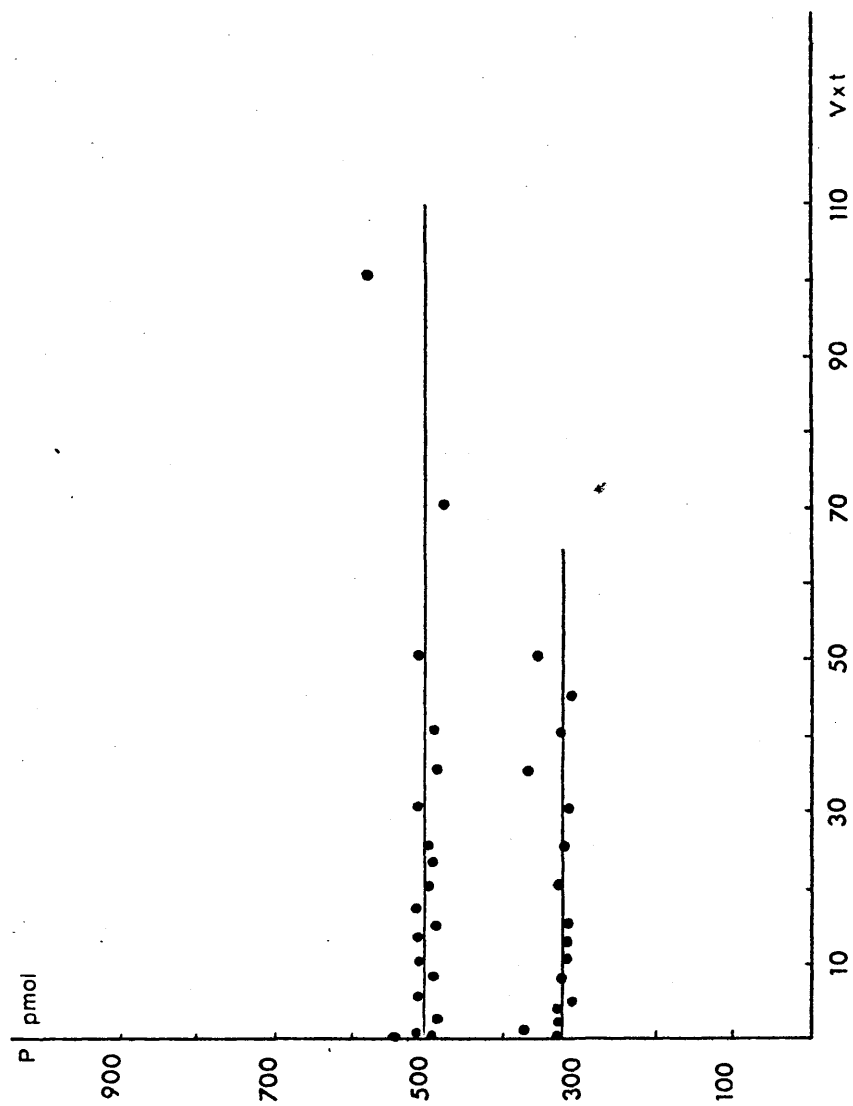


Figure 46

$$h_{(3')OH} = 2$$

En el primer caso de ajuste, el valor hasta el que se minimiza la función χ^2 , para el conjunto de valores dados para los parámetros, era 18,9 siendo el valor más bajo encontrado para todos los conjuntos de valores de los parámetros que minimizan la función χ^2 . El número de grados de libertad es, en ese caso, 16. En el segundo caso de ajuste, para el conjunto de valores de los parámetros dado, la función χ^2 se minimiza hasta el valor 17,3 siendo el más bajo de los valores mínimos obtenidos para todos los conjuntos de valores de los parámetros que minimizan la función χ^2 . En este caso, el número de grados de libertad es 16.

A pesar de la simplicidad de la expresión a ajustar, se utilizó el programa de ajuste descrito anteriormente por presentar la ventaja de buscar simultáneamente los mejores valores para cada parámetro que minimiza la función χ^2 .

Los valores ajustados para K en estos dos casos presentan una dispersión menor del 10%, manteniéndose dentro del orden de dispersión encontrada en los casos de ajuste anteriores. El ajuste en ambos casos conduce a valores diferentes de $d_{(3')OH}^0$, correspondiendo los valores mayores de densidad inicial a las muestras que presentan polimerizaciones mas altas, cosa que está de acuerdo con lo predicho a través de la expresión (III.15) anteriormente citada.

Los valores de los parámetros ajustados comunes a cada una de las experiencias ajustadas anteriormente presentan dispersiones inferiores al 10%, tolerables frente a los valores de dispersión de los datos experimentales. Estos valores ajustados aparecen agrupados en la $\bar{\tau}_1$

bla 19. Como puede verse en esa tabla, los valores ajustados para K son los mismos, dentro de la dispersión dicha, cualquiera que sea el método utilizado para degradar la muestra de DNA. Esto confirma nuestra suposición de que la eficacia de polimerización por punto de iniciación de la síntesis es independiente, no sólo del grado de alteración de la muestra utilizada como molde, sino de las características estructurales de la alteración producida sobre la cadena polinucleotídica. Se confirma, además, nuestra interpretación de que en el anterior tratamiento de datos los valores anormales obtenidos para K^1 , para el caso de DNA molde degradado por irradiación gamma, eran debidos solo a efectos del fraccionamiento cromatográfico.

Los valores obtenidos para $d_{(3')OH}^0$ en cada uno de los ajustes realizados, para cada uno de los métodos de degradación empleados sobre la muestra de DNA utilizada como molde, presentan una gran dispersión. Esto resulta justificable cuando se tiene en cuenta que las muestras de DNA utilizadas en lotes de experiencias distintas, para cada uno de los métodos de degradación utilizados para producir alteraciones dentro de la muestra, procedían de aislamientos distintos que, aunque se realizaban según la misma técnica y a partir de cultivos equivalentes procedentes de una misma cepa, pueden llevar a valores de densidad de roturas simples iniciales bastante dispersos.

IV.3.3. CONSTANTE DE EFICACIA DE LA CANTIDAD DE POLIMERIZACION DETECTADA.

La constante de eficacia ajustada, K, al ser una constante de proporcionalidad entre la polimerización detectada y la densidad de grupos (3')-OH de la

TABLA 19

Método de degradación muestra DNA molde	K	$d_{(3')OH}^o$	h_R	$h_{(3')OH}$	k_1	k_2
Radiación gamma	20,6	$7,7 \cdot 10^{-4}$	6,9	2		$0,34 \cdot 10^{-4}$
	18,2	9,8	6,1			
Tratamiento DNasa	19,6	5,7		2	$2,1 \cdot 10^{-4}$	
	21,2					
Mecánico	18,7	5,6		2		
	19,2	7,7				

muestra de DNA molde, representa el número de monómeros que, por término medio, se detecta que se incorporan a la fracción polímero por cada uno de los puntos de iniciación de polimerización determinados sobre las muestras de DNA molde.

Si, como hemos aceptado en una primera aproximación, consideramos que K no varía ni con el método ni con el grado de degradación, podemos afirmar que, por término medio, se detecta igual número de monómeros polimerizados por punto de iniciación existente cualquiera que sea el grado de degradación experimentado por la muestra de DNA molde. Esto nos puede llevar a conclusiones un tanto especulativas. Si tenemos en cuenta que al variar la $d_{(3')OH}$ varía también la distancia media entre dos roturas simples, ya que la longitud media entre roturas simples expresada en cantidad de nucleótidos viene dada por:

$$\bar{L} = \frac{1}{2 \cdot d_{(3')OH}} - (2h + 1) \quad (IV.2)$$

y que, sin embargo, la longitud polimerizada por término medio por cada punto de iniciación es siempre la misma, podríamos concluir que la polimerización se detiene después de polimerizar K nucleótidos, por cada punto de iniciación, cualquiera que fuese la longitud que podría polimerizar hasta encontrar otras roturas simples, dentro de un intervalo $(2h + 1)$, que impidiese la continuación de la polimerización por dar lugar a la fractura de la molécula.

La radiolisis produce una disminución de la longitud media polimerizable, ya que no solo incrementa el número de roturas simples de la muestra sino que da lugar a la alteración de bases que no producen rotura

dentro de la cadena polinucleotídica pero que pueden impedir la continuación de la polimerización por no ser en ese punto molde eficaz para dirigir la incorporación de un nuevo monómero. La longitud media polimerizable, expresada en número de nucleótidos, puede venir dada por:

$$\bar{L} = \frac{1}{2 (d_R + d_{(3')OH}^o + d_{BA})} - (2h + 1)$$

expresando por d_{BA} la densidad de bases alteradas que a su vez puede venir dada en función de la dosis, de la forma: $d_{BA} = \beta D$, con lo que:

$$\bar{L} = \frac{1}{2 (d_{(3')OH}^o + (k_2 + \beta) D)} - (2h + 1)$$

Todas estas consideraciones nos llevan por tanto a pensar que la longitud polimerizada por punto de iniciación existente en la muestra es un valor independiente del grado de degradación o del tipo de alteración producida sobre la muestra de DNA y que, en cambio, sería característica del comportamiento de la enzima en las condiciones utilizadas.

Sin embargo, ninguna de estas afirmaciones puede considerarse con más valor que el puramente especulativo, ya que esta K que hemos observado independiente de las características estructurales del DNA molde, es una constante que engloba no solo la eficacia y extensión de la polimerización, sino también la eficacia de unión de la enzima a los puntos de iniciación de la muestra de DNA y la eficacia de detección de la polimerización conseguida. Puede ocurrir que cada una de estas eficacias se afecte diferentemente con la degradación del DNA, apareciendo globalmente independiente o bien que cada una de ellas por separado resulte independiente de la alteración experimentada por el DNA, al menos en los márgenes entre los que nos movemos en este trabajo. No poseemos datos

directos para discutir sobre la influencia del grado de degradación del molde sobre la eficacia y extensión de la polimerización por punto de iniciación ni sobre la eficacia de unión enzima-DNA, aunque los datos recogidos de la literatura sobre este último aspecto nos llevan a la conclusión de que el número de moléculas de enzima unidas a una molécula de DNA es proporcional al número de grupos (3')-OH libres existentes en la molécula y que la eficacia de unión enzima-DNA por punto de unión no parece afectada por el grado de degradación que presenta el DNA.

En cambio, si poseemos datos directos sobre la eficacia de detección de la cantidad de polímero sintetizado en función de la degradación del DNA. De los datos presentados en la Tabla 20, se deduce que la eficacia es independiente del grado de alteración experimentado por el DNA, por lo menos dentro de los márgenes entre los que nos hemos movido en este trabajo.

Podemos deducir, entonces, que como tanto la constante global de eficacia como la eficacia de unión enzima-DNA y la eficacia de detección aparecen independientes del grado de alteración experimentado por el DNA, la eficacia y extensión de la polimerización por punto de iniciación existente debe ser también independiente de las características estructurales del DNA molde y depender solo de las características de comportamiento de la DNA Polimerasa en las condiciones utilizadas.

Los valores de eficacia de detección presentados han sido calculados sobre muestras de DNA-³H a las que se ha sometido al proceso de detección exclusivamente.

TABLA 20

<u>d_{RS}</u>	<u>eficiencia detección</u>
20,6.10 ⁻⁴	3,71%
22,3	3,68
28,4	3,52
32,5	3,80
36,2	3,57
42,8	3,62
47,6	3,73
52,5	3,56
58,1	3,64
61,5	3,72
66,3	3,59
68,8	3,70

valor medio 3,65
dispersión 3%

Otra razón que apoya la idea que venimos comentando de que la enzima no polimeriza mas allá de un número K de nucleotidos por cada punto de iniciación existente, a pesar de que la longitud media polimerizable por punto de iniciación sea mayor, puede ser dada cuando se calcula la polimerización que por término medio se obtendría si se polimerizasen la longitud media existente entre dos roturas simples en una distribución media. La cantidad de polimerización en esas condiciones vendría dada por el producto de la longitud media polimerizable por la mitad de los puntos de iniciación de polimerización existentes en la muestra ya que las polimerizaciones iniciadas en dos puntos situados en cadenas antiparalelas y separados por una distancia de \bar{l} pares de nucleotidos dan lugar a la incorporación de \bar{l} nuevos monómeros:

$$P = \bar{1} \cdot \frac{N_{(3')OH}}{2}$$

donde, sustituyendo el valor de $\bar{1}$ de la expresión (IV.2) y expresando $N_{(3')OH}$ en función de $d_{(3')OH}$, se obtiene:

$$P = \left[\frac{1}{(2 d_{(3')OH}} - (2h + 1) \right] \frac{d_{(3')OH} \cdot N}{2}$$

simplificando:

$$P = \frac{N}{2} \left[\frac{1}{2} - (2h + 1) d_{(3')OH} \right]$$

Según esta expresión, la cantidad de polímero sintetizado disminuye linealmente al aumentar la densidad de roturas simples con grupos (3')-OH existente en la muestra, cosa que está en desacuerdo no solo con nuestros resultados experimentales sino con datos de la literatura. En el caso de utilizar la expresión de $\bar{1}$ para muestras irradiadas, que aparece corregida por la existencia de roturas simples con cualquier otro grupo libre y de bases alteradas, la cantidad de polímero sintetizado vendría dado por

$$P = \left[\frac{1}{2(d_{(3')OH}^o + (k_2 + \beta) D)} - (2h + 1) \right] \frac{d_{(3')OH} \cdot N}{2}$$

que igualmente aparece en desacuerdo con nuestros resultados experimentales. Esto nos permite apoyar la idea de que la polimerización no continúa mas allá de un número K de nucleótidos por cada punto de iniciación de la polimerización, independientemente de las características estructurales del DNA utilizado como molde.

Otra cuestión importante a resolver en el caso de aceptar esta idea es el de justificar el orden de los valores obtenidos para K en el ajuste de los datos experimentales. Empecemos comparándolos con los valores de longitud media polimerizable para las muestras utilizadas en las experiencias presentadas en este trabajo. Las muestras de DNA presentaban densidades de roturas simples comprendidas entre 10^{-3} y 10^{-2} $\frac{\text{pmol nucleotido extremo}}{\text{pmol nucleotido total}}$. Esto quiere decir que la longitud media entre dos roturas simples estaría comprendida para esas muestras entre 500 y 50 $\frac{\text{pmol nucleotido}}{\text{pmol nucleotido extremo}}$. Teniendo esto en cuenta, el valor ajustado para K de $20 \frac{\text{pmol nucleotido}}{\text{pmol nucleotido extremo}}$ resulta dentro del orden de magnitud esperable para esta constante.

Los datos aportados por la literatura sobre el número de nucleotidos escindidos por cada dímero de timina en la reparación de la lesión ultravioleta, dato que hasta cierto punto puede ayudarnos, es de $20^{(240)}$, $30^{(212)}$, o valores oscilando entre 29 y $38^{(327)}$.

En el caso de mantener la idea que venimos comentando, esto significaría que la polimerización se para después de haber incorporado al DNA, por término medio, 20-30 nucleotidos por cada punto de iniciación existente en la muestra.

V. CONCLUSIONES.

Sobre la base de que sólo los extremos de cada una que poseen grupos (3')-OH libres y forman parte de una rotura simple son puntos de unión a la DNA Polimerasa hábiles para iniciar la polimerización, nuestros resultados experimentales confirman que son correctas las expresiones que proponemos para la $d_{(3')OH}$ y, en consecuencia, para la polimerización en función de la extensión del tratamiento degradativo de la muestra.

En la expresión de $d_{(3')OH}$ para el proceso radiolítico se ha supuesto la no producción de nuevos extremos con grupos (3')-OH libres durante la degradación. El buen ajuste de esta expresión a los resultados experimentales indica que la expresión propuesta es suficientemente buena.

El método de estimación de la densidad de roturas simples constituye nueva confirmación de que la expresión utilizada para su determinación es adecuada para describir procesos degradativos de mecanismos haplotómicos.

Por otro lado, vistos los resultados del estudio comparativo de los métodos de detección de la polimerización, podemos afirmar la adecuación del método de cromatografía sobre DEAE-celulosa para la detección de la cantidad de polímero sintetizado.

El hecho de que el número de nucleótidos polimerizados por punto de iniciación tenga un valor discreto e independiente de la degradación experimentada por la muestra de DNA utilizada como molde, nos lleva a concluir que, en nuestras condiciones experimentales, la polimerización, una vez iniciada, no continua indefini

damente, sino que se detiene después de polimerizar un corto número de unidades.

El orden de magnitud del número de nucleótidos incorporados por cada punto de iniciación de la polimerización, análogo, por otra parte, al obtenido en la síntesis de reparación enzimática de lesiones ultravioleta en DNA, apoya la suposición de que la DNA Polimerasa puede desempeñar un papel importante en el sistema enzimático de reparación de alteraciones estructurales en DNA.

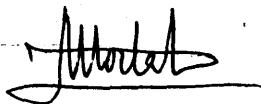
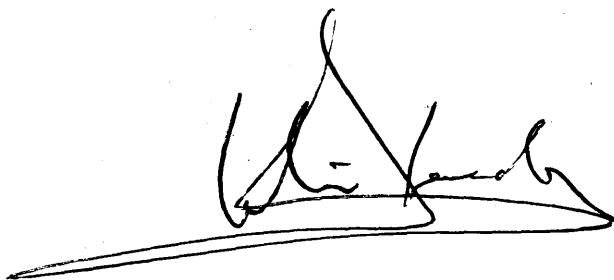
Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral con la censura de Sobresaliente cum laude

Madrid,

26 de junio de 1974

José Sancho del Río

Alcalá



Antonio Kiborn



BIBLIOGRAFIA

1. WATSON, J.D., F.H.C. CRICK.- Nature 171 (1953) 964].
2. BECKER, A., J. HURWITZ, en "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.- J.N. DAVIDSON, W.E. COHN.- Ed. Academic Press.- 11 (1971) 423.
3. GOULIAN, M.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 11.
4. SINSHEIMER, R.L., en "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.- J.N. DAVIDSON, W.E. COH.- Ed. Academic Press.- 8 (1968) 115.
5. MAKOVER, S., in "Informative Molecules in Biological Systems".- (L. Ledoux ed.) p. 267.- North Holland Publ. Co.- Amsterdam.- (1971).
6. WU, R., A.D. KAISER.- J. Mol. Biol.- 35 (1968) 523.
7. KHORANA, H.G., H. BUCHI, M.H. CARUTHERS, S.H. CHANG, N.K. GUPTA, A. KUMAR, E. OHTSUKA, V. SGARAMELLA, H. WEBER.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.- 33 (1968) 35.
8. KORNBERG, A.- Science 163 (1969) 1410.
9. KORNBERG, T., M.L. GEFTER.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 (1971) 761.
10. KORNBERG, T., M.L. GEFTER.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 5369.

11. MESELSON, M., F.W. STAHL.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 44 U.S. 44 (1958) 671.
12. GOUCIAN, M., en "Progress in Nucleic Acid Research and and Molecular Biology 12.- J.N. DAVIDSON, W.E. COHN, Ed. Academic Press.- (1972) 29.
13. KELLY, R.B., M.R. ATKINSON, J.A. AUBERMAN, A. KORNBERG.- Nature 224 (1969) 495.
14. WERNER, R.- Biophys. J. (abstr.) 11 222a (1971).
15. OKAZAKI, R., T. OKAZAKI, K. SALGABE, K. SUGIMOTO, R. KAINUMA, A. SUGINO, N. IWATSUKI.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 129.
16. DELBRUCK, M., en "Heritage from Mendel".- (R.A. BRINK, ed.) pág. 65.- Univ. of Wisconsin Press. Madison (1967).
17. GOULIAN, M., A. KORNBERG, R.L. SINSHEIMER.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58 (1967) 2351.
18. YOSHIDA, S., L.F. CAVALIERI.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 (1971) 200..
19. CHANG, L.M.S., F.J. BOLLUM.- J. Biol. Chem. 246 (1971) 5835.
20. LEHMAN, I.R., M.J. BESSMAN, E.S. JIMMS, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 233 (1958) 163.
21. KORNBERG, T., M.L. GEFTER.- Biochem. Biophys Res. Commun. 40 (1970) 1348.
22. MILLER, L.K., R.D. WELLS.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 2667.

23. OKAZAKI, T., A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 209
(1964) 259.
24. BOLLUM, F.J.- J. Biol. Chem. 235 (1960) 2369.
25. RECONDO, A.M., O. FICHOT.- Biochim. Biophys. Acta
186 (1969) 340.
26. APOSHIAN, H.V., A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 237
(1962) 519.
27. ENGLUND, P.T.- J. Biol. Chem. 246 (1971) 5684.
28. SMITH, D.W., H.E. SCHALLER, F.J. BONHOEFFER.-
Nature 226 (1970) 711.
29. MOSES, R.E., C.C. RICHARDSON.- Proc. Nat. Aca.
Sci. US 67 (1970) 674.
30. RICHARDSON, C.C.- Ann. Rev. Biochem. 38 (1969)
795.
31. RICHARDSON, C.C., C.L. SCHILDKRAUT, H.J. APOSHIAN,
A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 239 (1964) 222.
32. JOVIN, T.M., P.T. ENGWIND, L.L. BERTSCH.- J. Biol.
Chem. 244 (1969) 2996.
33. KNIPPERS, R.- Nature 228 (1971) 1050.
34. DE LUCIA, P., J. CAIRNS.- Nature 224 (1969) 1164.
35. MOSES, R.E., C.C. RICHARDSON.- Biochem. Biophys.
Res. Commun. 41 (1970) 1557.
36. MOSES, R.E., C.C. RICHARDSON.- Biochem. Biophys.
Res. Commun. 41 (1970) 1565.

37. COZZARELLI, N.R., R.B. KELLY, A. KORNBERG.- J. Mol. Biol. 45 (1968) 513.
38. HOWARD-FLANDERS, P.- Ann. Rev. Biochem. 37 (1968) 175.
39. GROSS, J., M. GROSS.- Nature 224 (1969) 1166.
40. STRATLING, W., R. KNIPPERS.- Eur. J. Biochem. 20 (1971) 330.
41. KORNBERG, T., M.C. GEFTER.- Fed. Proc. 30 (1971). 1110.
42. GEFTER, M.L., Y. HIROTA, T. KORNBERG, J. WECHLER, C. BARNOUX.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 (1971) 3150.
43. NUSSLEIN, V., B. OTTO, F. BONHOEFFER, H. SCHALLER.- Nature 234 (1971) 285.
44. KELLEY, W.S., H.J. WHITFIELD.- Nature 230 (1971) 33.
45. SMITH, D.W., H.E. SCHALLER, F.J. BONHOEFFER.- Nature 226 (1970) 711.
46. KNIPPERS, R., W. S. TRIATLING.- Nature 226 (1970) 713.
47. OKAZAKI, R., K. SUGIMOTO, T. OKAZAKI, Y. IMAE, A. SUGINO.- Nature 228 (1970) 223.
48. VOSBERG, H.P., H. HOFFMANN-BERLING.- J. Mol. Biol. 58 (1971) 738.

49. DURWALD, H., H. HOFFMANN-BERLING.- J. Mol. Biol.
58 (1971) 755.
50. MORDOH, J., Y. HIROTA, F. JACOB.- Proc. Nat. Acad.
Sci. US 67 (1970) 773.
51. GANESAN, A.T., Cold. Sprinb Harbor Symp. Quant.
Biol. 33 (1968) 45.
52. GANESAN, A.T., Proc. Nat. Acad. Sci. US. 61 (2958)
1058.
53. FRANKEL, F.R., C. MAJUMDAR, S. WEINTRAUB, D.M.
FRANKEL.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
33 (1968) 495.
54. KOERNER, J.F., M.S. SMITH, J.M. BUCHANAN.- J. Mol.
Chem. 235 (1960) 2691.
55. BONHOEFFER, F., R. HERRMANN, U. NUBLEIN, B. OTTO,
H. SCHALLER.- Biophys. Soc. Abstr. 11 (1971) 228a.
56. IWATSUKI, N., R. OKAZAKI,- J. Mol. Biol. 52 (1970)
37.
57. OKAZAKI, R., T. OKAZAKI, K. SAKABE, K. SUGIMOTO,
A. SUGINO.- Proc. Nat. Acad. Sci. US. 59 (1968)
598.
58. KLENOW, H., I. HENNINGSEN.- Proc. Nat. Acad. Sci.
USA 65 (1970) 168.
59. LEZINS, A.G., S.B. HENNING, C. MENZEL, E. METZ.-
Eur. J. Biochem. 2 (1967) 90.
60. CAVALIERI, L.F., E. CARROLL.- Proc. Nat. Acad. Sci.
USA 59 (1968) 951.

61. CAVALIERI, L.F., E. CARROLL, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 (1970) 1055.
62. YOSHIDAS, S., L.F. CAVALIERI, Fed. Proc. 29 (1970) 406.
63. CAVALIERI, L.F., E. CARROLL.- Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67 (1970) 807.
64. YOSHIDA, S., L.F. CAVALIERI.- Biochem. Biophys. Acta 224 (1970) 647.
65. BOLLUM, F.J., en "G.L. CANTONI, D.R. DAVIES (Ed.) "Procedures in Nucleic Acid Research", Harper-Row, New York (1966). p. 296.
66. HOWARD-FLANDERS P., R.P. BOYCE, L. THERIOT.- Genetics, 53 (1966) 1119.
67. SETLOW, P., D. BRUTLAG, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 224.
68. BRUTLAG, D., M.R. ATKINSON, P. SETLOW, A. KORNBERG.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969) 982.
69. GOULIAN, M., Z.J. LUCAS, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 243 (1968) 627.
70. WEISS, B.- Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65 (1970) 652.
71. BRUTLAG, D.- Fed. Proc. 30 (1971) 327.
72. HALL, Z.W., I.R. LEHMAN.- J. Mol. Biol. 36 (1968) 321.
73. ENGLUND, P.T.- J. Biol. Chem. 246 (1971) 3269.

74. GREEN, M.- Annu. Rev. Biochem. 39 (1970) 701.
75. TEMIN, H.M.- Nat. Cancer Inst. Monogr. 17 (1964) 557.
76. TEMIN, H.M. en "The Biology of Large RNA Viruses" (R.D. BARRY y B.W.d MAHY, eds.) p. 233. Academic Press, New York (1970).
77. MIZUTANI, S., H.M. TEMIN.- Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol. 35 (1970) 847.
78. TEMIN, H.M., S. MIZUTANI.- Nature 226 (1970) 1211.
79. HUEBNER, R.J., G.J. TODARO.- Proc. Nat. Acad. Sci. US. 64 (1969) 1087.
80. KATES, J.R., B.R. Mc AUSLAN.- Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58 (1967) 134.
81. BACTIMORE, D.- Nature 226 (1970) 1209.
82. SPIEGELMAN, S., A. BURNY, M.R. DAS, J. KEYDAR, J. SHLOM, M. TRAUNICEK, K. WATSON.- Nature 227 (1970) 563.
83. GREEN, M., M. ROKUTANDA, K. PUJINAGA, R.K. RAY, H. ROKUTANDA, C. GURGO.- Proc. Nat. Acad. Sci. US. 67 (1970) 385.
84. MIZUTANI, S., D. BOETTIGER, H.M. TEMIN.- Nature 228 (1970) 424.
85. GARAPIN, A.C., J.P. Mc DONNELL, W. LEVINSON, N. QUIN TRELL, L. FANSHIER, J.M. BISHOP,- J. Virol 6 (1970) 589.

86. FANSHIER, L., A.C. GARAPIN, J. Mc DONNEL, A. FARAS, W. LEVINSON, J.N. BISHOP.- J. Virol. 7 (1971) 77.
87. MANLY, K.F., D.F. SMOLER, E. BROMFELD, D. BALTIMORE. J. Virol 7 (1971) 106.
88. ROKUTANDA, M., H. ROKUTANDA, M. GREEN, K. FUJINAGA, R.K. RAM, C. GURGO.- Nature 227 (1970) 1026.
89. HATANAKA, M., R.J. HUEBNER, R.U. GILDEN.- Proc. Nat. Acad. Sci. US 68 (1971) 10.
90. FUJINAGA, K., J.T. PARSONS, J.W. BEARD, D. BEARD, M. GREEN.- Proc. Nat. Acad. Scie. US. 67 (1970) 1432.
91. GARAPIN, A.C., L. FANSHIER, J.A. LEONG, J. JAKSON, W. LEVINSON, J.M. BISHOP.- J. Virol 7 (1971) 227.
92. Mc DONNEL, J.P., A.C. GARAPIN, W.E. LEVINSON; N. QUINTRELL, L. FANSHIER, J.M. BISHOP.- Nature 228 (1970) 435.
93. GURGO, G., R.K. RAY, L. THIRY, M. GREEN.- Nature New Biol. 229 (1971), 111.
94. GERWIN, B.I., G.J. TODARO, U. ZEVE, E.M. SCOLNICK, S.A. AARONSON.- Nature 228 (1970) 435.
95. SCOLNICK, E., E. RANDS, S.A. AARONSON, S.J. TODARO.- Proc. Nat. Acad. Scie. US. 67 (1970) 1789.
96. RIMAN, J., G.S. BEQUDREAU.- Nature 228 (1970) 427.
97. SPIEGELMAN, S., A. BURNY, M.R. DAS, J. KEYDAR, Y. SCHOLM, M. TRAUNICEK, K. WATSON.- Nature 227 (1970) 1029.

98. LEVINSON, W., J.M. BISHOP, N. QUINTRELL, J. JACKSON.- Nature 227 (1970) 1023.
99. HATANAKA, M., R.J. HUEBNER, R.U. GILDEN.- Proc. Nat. Acad. Scie. US. 67 (1970) 143.
100. SHLOM, J., D.H. HARTER, Q. BURNY, S.SPIEGELMAN.- Proc. Nat. Acad. Scie. US 68 (1971) 182.
101. MIZUTANI S, H.M. TEMIN, M. KODAMA, R.T. WELLS.- Nature New Biol. 230 (1971) 232.
102. STONE, L.B., E.M. SCOLNICK, K.K. TAKEMOTO, S.A. AARONSON.- Nature 229 (1971) 257.
103. PARKS, W.P., G.J. RODARO, E.M. SCOLNICK, S.A. AARONSON.- Nature 229 (1971) 258.
104. LIN, F.H., H.T. HORMAR.- J. Virol 6 (1970) 702.
105. SCOLNICK, E.M., S.A. AARONSON, G.J. TODARO, W.P. PARKS.- Nature 229 (1971) 318.
106. WEBER, G.H., A.A. KIESSLING, G.S. BEAUDREAU.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 (1971) 993.
107. BOSMANN, H.B., FEBS Lett. 13 (1971) 121.
108. PENNER, P.E., L.H. COHEN, L.A. LOEB.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 (1971) 1228.
109. LEE-HUANG, S., L.F. CAVALIERI.- Proc. Nat. Acad. Scie. US 50 (1963) 1116.
110. MILLER, L.K., R.D. WELLS.- Fed. Proc. 30 (1971) 1109.

111. HARWOOD, S.J., P.F. SCHENDE, L.K. MULLER, R.D. WELLS.- Proc. Nat. Acad. Sci. US 66 (1970) 696.
112. HARWOOD, S.J., P.F. SCHENDEL, R.D. WELLS.- J. Biol. Chem. 245 (1970) 5614.
113. MILLER, L.K., D.D. WELLS.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 2675.
114. GANESAN, A.T.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 681 (1971) 1296.
115. LAIPIS, P.J., A.T. GANESAN.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 5867,
116. PEARLMAN, R., O. WESTERGAARD, C.R. Trav. Lad. Carlsberg 25 (1969) 77.
117. WESTERGAARD, O., R.E. PEARLMAN.- Exp. Cell Res. 54 (1968) 309.
118. CRERAR, M., R.E. PEARLMAN.- F.E.B.S. Letters 18 (1971) 231.
119. LOEB, L.A., B. FANSLER, R. WILLIAMS, D. MAZIA.-: Exp. Cell Res. 57 (1969) 288.
120. LOEB, L.A., J. Biol. Chem. 244 (1969) 1672.
121. BOLLUM, F.J., V.R. POTTER.- J. Biol. Chem. 233 (1958) 478.
122. BOLLUM, F.J.,- J. Biol. Chem. 235 (1960) PC 18, n^o 5.
123. MONTSAVINDS, R.- J. Biol. Chem. 239 (1964) 3431.

124. BOLLUM, F.J.- Science 144 (1964) 560.
125. BOLLUM, F.J., en L. GROSSMAN, K. MOLDAVE (Ed.)
"Methods in Enzymology", vol. XII Academic Press.
New York (1968), p. 591.
126. ROYCHOUDHURY, R., D.P. BLOCH.- J. Biol. Chem.
244 (1969) 3369.
127. ROYCHOUDHURY, R., D.P. BLOCH.- J. Biol. Chem.
244 (1969) 3359.
128. KEIR, H.M.- Biochem. J. 85 (1962) 265.
129. SHEPHERD, J.B., H.M. KEIR.- Biochem. J. 99 (1966)
443.
130. FURLONG, N.B.- Biochem. Biophys. Acta 114 (1966)
491.
131. KEIR, H.M., en "Progress in Nucleic Acid Research
and Molecular Biology".- J.N. DAVIDSON, W.E. COHN
Ed. Academic Press. 4 (1965) 81.
132. RECONDO, A.M., Biochem. Biophys. Acta. 114 (1966)
338.
133. RECONDO, A.M.- Biochem. Biophys. Acta. 145 (1967)
708.
134. BELLAIR, J.T.- Biochem. Biophys. Acta 161 (1968)
119.
135. SEDWICK, W.D., T. SHU-FONG WANG, D. KORN.- J. Biol.
Chem. 247 (1972) 5026.
136. GOULIAN, M.- Ann. Rev. Biochem. 40 (1971) 855.

138. KINGSBURY, D.T., D.R. HELINSKI,- Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 (1970) 1538.
139. JACOB, F., S. BRENNER, F. CUZIN.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 (1963) 329.
140. MENDELSON, N.H.- Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 313.
141. MENDELSON, N.H., J.D. GROSS.- J. Bacterial 94 (1967) 1603.
142. GROSS, J.D., D. KARAMATA, P.G. HEMPSTEAD.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 307.
143. KOHIYAMA, M.- Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 317.
144. KOHIYAMA, M., H. LANTROM, S. BRENNER, F. JACOB.- C.R. Acad. Sci. 257 (1963) 1979.
145. BONHOEFFER, F., W. SCHALLER.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 20 (1965) 193.
146. KAPLAN, J.C., S.R. KUSHNER, L. GROSSMAN.- Proc. U.S. Nat. Acad. Sci. 63 (1969) 144.
147. KLETT, R.P., A. CERAMI, E. REICH.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60 (1968) 943.
148. DEUTSCHER, M.P., A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 244 (1969) 3029.
149. KELLY, R.B., N.R. COZZARELLI, M.P. DEUTSCHER, T.R. LEHMAN, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 245 (1970) 39.

150. SETLOW, R.B., W.L. CARRIER, J.K. SETLOW.- Bio-phys. J. 9 (1963) A-57.
151. STRAUSS, B.S.- Curr. Topics Microbiol. Immunol 44 (1971) 1.
152. GOULIAN, M., A. KORNBERG.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58 (1967) 1723.
153. WITKIN, E.M.- Annu. Rev. Genet. 3 (1969) 525.
154. BOYLE, J.M., M.C. PATERSON, R.B. SETLOW.- Nature 226 (1970) 708.
155. WITKIN, E.M.- Nature (London) New. Biol. 229 (1971) 81.
156. KANNER, L., P. HANAWALT.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 39. (1970) 149.
157. KUEMPEL, P.L., G.E. VEOMETT.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 (1970) 973.
158. SCHEKMAN, R.W., M. IWAYA, K. BROMSTRUP, D.T. DENHARDT.- J. Mol. Biol. 57 (1971) 177.
159. DEUTSCHER, M.P., A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 244 (1969) 3019.
160. JOVIN, T.M., P.T. ENGWUND, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 244 (1969) 3009.
161. BEYERSMANN, D., G. SCHARMM.- Biochem. Biophys. Acta 159 (1968) 64.
162. JEHL, H.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53 (1965) 1451.

163. KUBITSCHKEK, H.E., T.R. HENDERSON.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55 (1966) 512.
164. KORNBERG, A., in "Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis".- V.V. Koningsberger and L. Bosch Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1967)p. 22.
165. KLENOW, H., K. OVERGARD-HANSE.- Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 6 (1970) 25.
166. SETLOW, P., A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 232.
167. BRUTLAG, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 241.
168. LITMAN, R.M.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 (1970) 91.
169. ATKINSON, M.R., A. KORNBERG.- Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 235.
170. ENGWD, P.T., M.P. DEUTSCHER, T.M. JOVIN, R.B. KELLY, N.R. COZARELLI, A. KORNBERG.- Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 1.
171. ENGLUND, P.T., R.B. KELLY, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 244 (1969) 3045.
172. GOULIAN, M.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 61 (1968) 284.
173. COZZARELLI, N.R., R.B. KELLY, A. KORNBERG.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60 (1968) 992.
174. ENGLUND, P.T., J.A. HUBERMAN, I.M. JOVIN, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 244 (1969) 3038.

175. HUBERMAN, J., A.KORNBERG.- J. Biol. Chem. 245
(1970) 5326.
176. LEHMAN, I.R., S.B. ZIMMERMAN, J. ADLER, M.J.
BESSMAN, E.S. SIMMS, A. KORNBERG.- Biochem. 44
(1958) 1191.
177. SCHILDKRAUT, C.L., C.C. RICHARDSON, A. KORNBERG.-
J. Mol. Biol. 9 (1964) 24.
178. RICHARDSON, C.C., R.B. IMMAN, A. KORNBERG.- J.
Mol. Biol. 9 (1964) 46.
179. RICHARDSON, C.C., C. SCHILDRAUT, H.U. APOSHIAN,
A. KORNBERG, W. BODMER, J. LEDERBERG en H.J. VO-
GEL, V. BRYSON, J.O. LAMPEN (Ed.) "Informational
macromolecules".- Academic Press. New York (1963)
p. 13-26.
180. KRUGH, T.R.- Biochem. 10 (1971) 2594.
181. RICHARDSON, C.C., I.R. LEHMAN, A. KORNBERG.- J.
Biol. Chem. 239 (1964) 251.
182. RICHARDSON, C.C., C.L. SCHILDKRANT, A. KORNBERG.-
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 (1963)
9.
183. BESSMAN, M., I.R. LEHMAN, E.S. SIMMS, A. KORNBERG.-
J. Biol. Chem. 233 (1958) 171.
184. WICKNER, R.B., B. GINSBERG, I. BECKOWER.- J. HURWITZ,
J. Biol. Chem. 247 (1972) 489.
185. GEFTER, M.L., I.J. MOLINEUX, T. KORNBERG, H.G. KHO
RANA.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 237.

186. MOSES, R.E.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 6031.
187. NOSSAL, N.G.- J. Biol. Chem. 244 (1969) 218.
188. BERGER, H., A.W. KOZINSKI.- Proc. Nat. Acad. Sci. US. 64 (1969) 897.
189. KARAM, J.D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969) 416.
190. CHAN, U.S., S. SHUGAR, K. EBISUZAK.- Virology 40 (1970) 403.
191. HOSODA, J., E. MATHEWS.- J. Mol. Biol. 55 (1971) 155.
192. KOZINSKI, A.W., M. MITCHELL.- J. Virol 4 (1969) 823.
193. KARAM, J.D., B. BARKER.- J. Virol 7 (1971) 260.
194. GELLERT, M., M.L. BULLOK.- Proc. Nat. Acad. Sci. US. 67 (1970) 1580.
195. HUBERMAN, J.A., M.R. ATKINSON, A. KORNBERG.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34 (1969) 326.
196. GOULIAN, M.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34 (1969) 330.
197. SUEOKA, N., W.G. QUINN.- Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 695.
198. LEHMAN, I.R., C.C. RICHARDSON.- J. Biol. Chem. 239 (1964) 233.
199. LEHMAN, I.R.- Ann. Rev. Biochem. 36 (1967) 645.

200. TAGAKI, Y., M. SEKIGUCHI, S. OKUBO, H. NAKAYAMA, K. SHIMADA, S. YASUDA, T. NISHIMOTO, H. YOSHIHARA.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 219.
201. COZZARELLI, N.R., R.B. KELLY, A. KORNBERG.- J. Mol. Biol. 51 (1970) 323.
202. HOWARD-FLANDERS, P., W.D. RUPP, B.M. WILKINS en "Replication and Recombination of Genetic Material" (edit. por Peacock, W.J. and Brock, R.D).- (Australian Academy of Sciences, Canberra 1968) 142.
203. SPEYER, J.F.- Biochem. Biophys Res. Commun. 21 (1965) 6.
204. SPEYER, J.F., J.D. KARMAN, A.B. LENNY.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31 (1966) 693.
205. DRAKE, J.W., E.F. ALLEN, S.A. FORSDER, R.M. PREPARATA, E.O. GREENING.- Nature 221 (1969) 1128.
206. ALLEN, E.F., I. ALBRECHT, J.W. DRAKE.- Genetics 65 (1970) 187.
207. MITRA, B., P. REICHARD, R.B. INMAN, L.L. BERTSCH, A. KORNBERG.- J. Mol. Biol. 24 (1967) 429.
208. KNIPPERS, R., T. KOMANO, R.L. SINSHEIMER.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59 (1968) 577.
209. KELLY, R.B., N.R. COZZARELLI, A. KORNBERG.- J. Mol. Biol. 24 (1967) 829.
210. KOMANO, T., R.K. NIPPERS, R.L. SINSHEIMER.- Proc. Nat. Acad. Sci. US. 59 (1968) 911.

211. DEUTSCHER, M.P., R.B. KELLY, A. KORNBERG.- J. Biol. Chem. 247 (1972) 722.
212. PETTIJOHN, D., P. HANAWALT.- J. Mol. Biol. 9 (1964) 395.
213. HOWARD-FLANDERS, P., R.P. BOYCE.- Radiat. Res. Suppl. 6 (1966) 156.
214. GILBERT, W., D. DRESSLER.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34 (1969) 525.
215. CAIRNS, J., C.I. DAVERN.- J. Cell. Physiol. 70 (suppl) (1967) 65.
216. SUEOKA, N.- Mol. Genet. 2 (1967) 1.
217. SCHNOS, M., R.B. INMAN.- J. Mol. Biol. 51 (1970) 61.
218. STEVENS, W.F., S. ADAYA, W. SZYBALSKI, en "The Bacteriophage Lom bde" (A.D. Nersley, ed.) p. 515.- Cold Spring Harbor Lab. New York 1971.
219. SCHNOS, M., R.B. INMAN.- J. Mol. Biol. 55 (1971) 31.
220. HIRT, B.- J. Mol. Biol. 40 (1969) 141.
221. LEE, C.S., N. DAVIDSON.- Biochem. Biophys Acta 204 (1970) 285.
222. TOMIZAWA, J., T. OGAWA.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 533.
223. GOTTESMAN, M.E., M.B. YARMOLINSKY.- Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 735.

224. EISEN, H., L. PEREIRA, D.A. SILVA, F. JACOB.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 755.
225. SUEOKA, N., en "Molecular Genetics". (J.H. Taylor ed.) p. 1, Academic Press, New York (1967).
226. LARK, K.G., Ann. Rev. Biochem. 38 (1969) 569.
227. BONHOEFFER, F., W. MESSER.- Ann. Rev. Genet. 3, (1969) 233.
228. CARO, L.G., C.M. BERG.- Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 559.
229. NISHIOKA, Y., A. EISENSTARK.- J. Bacterial 102 (1970) 320.
230. HUBERMAN, J.A., A.D. RIGGS.- J. Mol. Biol. 32 (1968) 327.
231. HUBERMAN, J.A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 509.
232. CAIRNS, J.- J. Mol. Biol. 6 (1963) 208.
233. CAIRNS, J.- J. Mol. Biol. 15 (1966) 372.
234. KIDSON, C., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968) 179.
235. SUEOKA, N.- 3, p. 38 en "Cell Synchrony".- Academic Press, New York. (1965).
236. MITRA, S., A. KORNBERG.- J. Gen. Physiol. 49 (1966) 59.

237. RYTER, A., F.JACOB.- Compt. Rend. Acad. Sci. 257
(1963) 3060.
238. SMITH, D.W., P.C. HAUAWALT.- Biophys. Soc. Abstr.
162 (1965).
239. SMITH, D.W., P.C. HANAWALT.- Biochem. Biophys. Ac-
ta 149 (1967) 519.
240. SETLOW, R.B., W. CARRIER.- Proc. Nat. Acad. Sci.
Wash. 51 (1964) 226.
241. BOYCE, R.P., P. HOWARD-FLANDERS.- Proc. Nat. Acad.
Sci. Wash. 51 (1964) 293.
242. NOGUTI, T., T. KADA.- J. Mol. Biol. 67 (1972) 507.
243. GROSSMAN, L, J.C. KAPLAN, S.R. KUSHNER, I. MAHLER.-
Cold.Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 (1968)
229.
244. NAYAKAMA, H., S. OKUBO, M. SEKIGUCHI, Y. TAKAGI.-
Biochem. Biophys Res. Commun. 27 (1967) 217.
245. DONELSON, J.E., R. WU.- J. Biol. Chem. 247 (1972)
4654.
246. WU, R., E. TAYLOR.- J. Mol. Biol. 57 (1971) 491.
247. PADMANABHAN, R., R. WU.- Fed. Proc. 30 (1971)
1110 Abs.
248. WEISS, B., C.C. RICHARDSON.- J. Mol. Biol. 23 (1967)
405.
249. DONELSON, J.E., R. WU.- J. Biol. Chem. 247 (1972)
4661.

250. MINGOT, F.- Tesis doctoral.- Departamento de Publicaciones. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense de Madrid.- (1972).
251. DERTINGER, H., H. JUNG, en "Molecular Radiation Biology".- Springer-Verlag.- BERLIN.- (1970),- p. 41.
252. WEISS, J.- Nature 186 (1960) 751.
253. WEISS, J.- J. Radiation Res. Suppl. 4 (1964) 141.
254. HOCHANADEL, C.J.- Radiation Res. Suppl. 4 (1964). 150.
255. ADAMS, G.E.- Current Topics Radiation Res. 3 (1967) 1.
256. BAXENDALE, J.H.- Radiation Res. Suppl. 4 (1964) 114.
257. DANIELS, M., G. CHOLES, J.J. WEISS.- J. Chem. Soc. (1956) 852.
258. SCHOLES, G.- Proc. Biophys. Mol. Biol. 13 (1963) 59.
259. SCHOLES, G., J. WEISS.- Exptl. Cell. Res. Suppl. 2 (1952) 219.
260. HOLIAN, J., W.M. GARRISON.- J. Phys. Chem. 71 (1967) 462.
261. SCHOLES, G., P. SHAW, R.L. WILLSON, M. EBERT, en "Pulse Radiolysis".- Ed. M. Ebert, J.P. Keene, A. D. Swallow, J.H. Baxendale.- Academic Press. New York (1965) p. 151.

262. LATARJET, R., B. EKERT, P. DEMENSEMAN.- P. Radiation Res. Suplemento 3 (1963) 247.
263. DANIELS, M., G. SHOLES, J.J. WEISS., C.H. WHEELER.- J. Chem. Soc. (1957) 226.
264. WEISS, J.J.- Prog. Nucleic Acid Res. 3 (1964) 103.
265. SHOLES, G., J.F. WARD, J.J. WEISS.- J. Mol. Biol. 2 (1960) 379.
266. LINSTED, R.P., L.N. OWEN, R.E. WEBB.- J. Chem. Soc. (1953) 1211.
267. ULLRICH, M., U. HAGEN.- Intern. J. Radiat. Biol. 19 (1971) 507.
268. McDONALD, M.R.- Methods in Enzymology 2 (1955) 438.
269. KURNICK, N.B.- Methods of Biochemical Analysis 9 (1962) 1.
270. LASKOWSKI, M. Sr. The enzymes 5 (1961) 125.
271. CHARGAFF, ; J. Biol. Chem. (1952).
272. LEHMAN, I.R.- Progress in Nucleic Acid Research 2 (1963) 84.
273. KUNITZ, M.- J. Gen. Physiol. 33 (1950) 363.
274. CAVALIERI, L.F., B. HATCH.- J. Ann. Chem. Soc. 75 (1953) 1110.
275. SCHMIDT, . - en The Nucleic Acids" I. (1955)p. 555.

276. ZOMENHOI CHARGAFF .- J. Biol. Chem.
(1950) 325.
277. BARMAN, en "Enzyme Handbook".- Springer-Verlag Ed. 1969.
278. WITZEL, H.- Progress in Nucleic Acid Research.-
2 (1963) 221.
279. THOMAS, C.A.- J. Ann. Chem. Soc. 78 (1956) 1861.
280. CHARLESBY, A.- Proc. Roy. Soc. A 242 (1954) 120.
281. LITTLE , BUTLER .- J. Biol. Chem.
(1951) 578.
282. FREIFELDER, D., R.F. DAVISON.- Biophys J. 2
(1962) 235.
283. RYABCHENKO, N.I., F.L. BRAGINSKAYA, I.Y. EL'PINER,
P.I. TSEITLIN.- Biofizika 9 (1964) 168.
284. PRITCHARD, N.J., D.E. HUGHES, A.R. PEACOCKE.-
Biopolymers 4 (1966) 259.
285. PEACOCKE, A.R., N.J. PRITCHARD.- Biopolymers 6
(1968) 605.
286. RICHARDS, O.C., P.D. BOYER.- J. Mol. Biol. 11
(1965) 327.
287. OBRENOVITCH, A., G. AUBEL-SADRON.- J. Chem. Phys.
68, 3 (1971) 521.
288. LEVINTHAL, C., P.F. DAVINSON.- J. Mol. Biol. 3
(1961) 674.

289. FRENKEL, J.- Acta Physicochim. URSS 14 (1944) 51.
290. LIPPINCOTT, E.R., R. SCHROEDEL.- J. Chem. Phys. 23 (1955) 1131.
291. HUGHES, D.E., W.L. NYBORG.- Science 138 (1962) 108.
292. CHALERBY, A.- Proc. Roy. Soc. A 224 (1954) 120.
293. CHARLESBY, A.- J. Polym. Sci. 15 (1955) 263.
294. COX, R.A., W.G. OVEREND, A.R. PEACOCKE, S. WILSON.- Nature 176 (1955) 919.
295. COX, R.A., W.G., OVEREND, A.R. PEACOCKE, S. WILSON.- Proc. Roy. Soc. B 149(1958) 511.
296. PEACOCKE, A.R., B.N. PRESTON,- Proc. Roy. Soc. B 153 (1960) 102.
297. HAGEN, U.- Strahlentherapie 124 (1964) 428.
298. HAGEN, U.- Biochim. Biophys. Acta 134 (1967) 45.
299. COLLYNS, B., S. OKADA, G. SCHOLLES, J.J. WEISS, C.M. WHEELER.- Radiation Res. 26 (1965) 526.
300. PEACOCKE, A.R., B.N. PRESTON.- Proc. Roy. Soc. B 153 (1960) 90.
301. HAGEN, U., R. WILD.- Strahlentherapie 124 (1964) 275.
302. TEMPERLEY, H.N.W.- Trans. Faraday Soc. 55 (1959) 515.
303. MARMUR, J.- J. Mol. Biol. 3 (1961) 208.

304. KAY, E.R., N.S. SIMMONS, A.L. DOUNCE.- J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) 1724.
305. FREIFELDER, D.- J. Mol. Biol. 35 (1968) 95.
306. LOWRY, O.H., N.J. ROSEMBROUGH, A.L. FARRAND, R.J. RANDALL.- J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.
307. SCHMIDT, TANNHAUSER.- Version de MUNRO, H.N., FLECK A. "Methods of Biochemical Analysis Interscience Publishers".- Vol. 14 (1966) 159.
308. DISCHE, T.- Mikrochemie 8 (1970) 4.
309. BURTON, K.- Biochem. J. 62 (1958) 315.
310. GRIWOOLD, B.L., F.L. HUMOLLER.- Anal. Chem. 23 (1951) 192.
311. DAVILA, C., P. CHARLES, L. LEDOUX.- J. Chromatog. 19 (1965) 382.
312. DAVILA, C., P. CHARLES, L. LEDOUX.- J. Chromatog. 19 (1965) 386.
313. ZIMM, D.H., D.M. CROTHERS.- Proc. Natl. Acad. Scie. US 48 (1963) 905.
314. EIGNER, J., G. SCHILDKRAUT, P. DOTY.- Biochim. Biophys Acta 55 (1962) 13.
315. CROTHERS, D.M., B.H. ZIMM.- J. Mol. Biol. 12 (1965) 525.
316. EIGNER, J., P. DOTY.- J. Mol. Biol. 12 (1965) 549.

317. VAN DER SCHANS, G.P., J.B.T., ATEN, J. BLOK.- Anal Biochem. 32 (1969) 14.
318. McEWEN, C.R.- Anal Biochem. 20 (1967) 114.
319. FORNAS, E.- Informe IS 3120/N-1 JEN.
320. RICHARDSON, C.C., en "Procedures in Nucleic Acid Research, Cantoni G.L, DAVIES, D.R., ed. Harper-Row Pub. (1966) 1, 263.
321. ELSWORTH, R., G.A. MILLER, A.R. WHITAKER, D. KITCHING, P.D. SAYER.- J. Appl. Chem. 17 (1968) 157.
322. JOVIN, T.M. .- Anal. Biochem. 9 (1962) (351).
323. HURWITZ, GOLD, ANDERS.- J. Biol. Chem. 239 (1964) = 3462.
324. BOLLUM, F.J. en "Procedures in Nucleic Acid Research. Cantoni, G.L., DAVIES, D.R., Ed.- Harper-Row Pub. (1966) 1, 296.
325. MINGOT, F., C. DAVILA,- Chromatog. (n° 7414) en prensa.
326. SHEPPEY, G.C., en "Program Library" C.E.R.N. D-505. 66/1558/5 (1966).
327. HEIJNEKER, H.L., H. PANNEKOEK, R.A. OOSTERBAAN, P.E. POUWELS, S. BRON, F. ARWERT, G. VENEMA.- Proc. Nat. Acd. US. 68 (1971) 2967.